

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio del papel inmunomodulador de los antipsicóticos atípicos  
Risperidona/Paliperidona**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Karina S. Mac-Dowell**

Directores

**Juan Carlos Leza Cerro  
Borja García Bueno**

**Madrid, 2016**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Farmacología



**Estudio del papel inmunomodulador de los antipsicóticos  
atípicos Risperidona/Paliperidona.**

**Karina S. Mac-Dowell Mata**

Madrid, 2015



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Farmacología



**Estudio del papel inmunomodulador de los antipsicóticos  
atípicos Risperidona/Paliperidona.**

**Karina S. Mac-Dowell Mata**

**Directores**

Dr. Juan Carlos Leza Cerro

Dr. Borja García Bueno

Madrid, 2015





Los Dres. Juan Carlos Leza Cerro, Catedrático de Universidad y Borja García Bueno, Contratado postdoctoral Ramón y Cajal, del Dpto. de Farmacología de la Fac. de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que la Tesis doctoral que tiene por título ***Estudio del papel inmunomodulador de los antipsicóticos atípicos Risperidona / Paliperidona*** ha sido realizada por Karina S. MacDowell Mata bajo su dirección en este Dpto.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid, a 24 de julio de 2015

Atentamente,



**Dr. JC Leza**



**Dr. B García Bueno**

**I. RESUMEN**

1. RESUMEN .....	2
2. ABSTRACT .....	5

**II. INTRODUCCIÓN**

1. EL ESTRÉS .....	10
1.1 Generalidades .....	10
1.2 Respuesta General al Estrés: Eje HHA .....	11
1.3 Estrés y Neuroinflamación .....	13
1.3.1 Citoquinas .....	14
1.3.2 Factor Nuclear de Transcripción <i>kappa B</i> .....	17
1.3.3 Enzimas Dependientes de la Vía del NFkB .....	18
1.4 Mediadores Antiinflamatorios .....	19
1.4.1 15d-PGJ <sub>2</sub> /PPAR $\gamma$ .....	19
1.4.2 15d-PGJ <sub>2</sub> /NRF2 .....	21
2. ESTRÉS Y SISTEMA INMUNE .....	24
2.1 Activación del Sistema Inmune Innato .....	25
2.1.1 Vía de Señalización del TLR3 y TLR4 .....	26
2.1.2 Activación Microglial .....	28
3. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE .....	33
4. ESQUIZOFRENIA .....	35
4.1 Generalidades .....	35
4.2 Fisiopatología de la Esquizofrenia .....	37
4.3 Tratamiento Farmacológico de la Esquizofrenia .....	40

**III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	46
1.1 Antecedentes .....	46
1.2 Justificación .....	52
2. HIPÓTESIS .....	53
3. OBJETIVOS .....	53

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

---

1. MODELOS ANIMALES .....	59
1.1 Diseño Experimental .....	59
1.1.1 Bloque 1: Estudio del Efecto de Risperidona y Paliperidona Sobre el Balance Pro/Anti Inflamatorio en un Modelo de Neuroinflamación Agudo Inducido por LPS .....	60
1.1.2 Bloque 2: Estudio del Efecto de Paliperidona en un Modelo de Neuroinflamación inducido por Estrés .....	62
1.1.3 Bloque 3: Estudio del Efecto de Paliperidona en un Modelo de Esquizofrenia Inducido por Infección Prenatal .....	66
2. MUESTRAS HUMANAS (ESTUDIO PEPS & FLAMMPEPS) .....	69
3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	71
3.1 Obtención de Muestras en Fresco .....	71
3.2 Obtención de Muestras Fijadas para Estudios Microscópicos .....	73
4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES .....	74
4.1 Obtención de Homogenizado Total .....	74
4.2 Obtención de Extractos Nucleares y Citosólicos .....	74
4.3 Cuantificación Proteica .....	75
4.4 Western Blot .....	75
4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) .....	78
4.6 Cuantificación de los Niveles de Inmunoglobulina A en Colon .....	81
4.7 Cuantificación de los Niveles Plasmáticos de LPS .....	82
4.8 Cuantificación de los Niveles de Citoquinas por ELISA .....	82
4.9 Cuantificación de la Actividad de los Factores de Transcripción .....	83
4.10 Cuantificación de los Niveles de Prostaglandinas en Corteza Prefrontal .....	84
4.11 Niveles de Peroxidación Lipídica en Corteza Prefrontal y Plasma .....	85
4.12 Determinación de los Niveles de Nitritos en Corteza Prefrontal y Plasma .....	86
4.13 Inmunofluorescencia .....	86
4.14 Test Comportamental .....	87
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	89

**V. RESULTADOS**

1. NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS .....	94
1.1 Efecto de Risperidona/Paliperidona en los Niveles de Citoquinas Proinflamatorias Inducidas por LPS en Corteza Prefrontal .....	94
1.2 Efecto de Risperidona/Paliperidona en la Activación de la Vía del NFκB Inducida por LPS en Corteza Prefrontal .....	95
1.3 Efecto de Risperidona/Paliperidona en los Marcadores Oxidativos/Nitrosativos Inducidos por LPS en Corteza Prefrontal .....	96
1.4 Efecto de Risperidona/Paliperidona en los Marcadores del Balance Antiinflamatorio Inducidos por LPS en Corteza Prefrontal .....	97
1.5 Efecto de Risperidona/Paliperidona en los Mediadores Inflamatorios Periféricos Inducidos por LPS .....	100
1.6 Resumen de Resultados .....	101
2. NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS .....	102
2.1 Efecto de Paliperidona en la Inflamación Inducida por Estrés en Corteza Prefrontal .....	102
2.2 Efecto de Paliperidona en los Mediadores Inflamatorios Periféricos Inducidos por Estrés .....	105
2.3 Efecto de Paliperidona en la Activación de la Vía del TLR4 Inducida por Estrés en Corteza Prefrontal .....	106
2.4 Efecto de Paliperidona en la Inflamación Intestinal Inducida por Estrés .....	107
2.5 Efecto de Paliperidona en la Activación de la Vía del TLR4 Inducida por DAMPS .....	109
2.6 Efecto de la Paliperidona en la Vía Antiinflamatoria 15d-PGJ <sub>2</sub> /PPARγ en Corteza Prefrontal .....	110
2.7 Efecto de Paliperidona en la Vía Antioxidante de NRF2 en PFC .....	112
2.8 Efecto de Paliperidona en la Activación Microglial (Fenotipo M1/M2) .....	116
2.9 Efecto de Paliperidona en el Sistema Endocannabinoide .....	124
2.10 Resumen de Resultados .....	130

3. NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR ACTIVACIÓN INMUNE PRENATAL .....	135
3.1 Efecto de Paliperidona en la Activación de la Vía del TLR3 Inducida por la Infección Inmune Prenatal en PFC .....	135
3.2 Efecto de Paliperidona en la Activación de la Vía del NFκB y la Posterior Inflamación Inducida por la Infección Inmune Prenatal en PFC .....	136
3.3 Efecto de Paliperidona en la Activación de la Vía Antioxidante de NRF2 .....	139
3.4 Efecto de Paliperidona en los Niveles de Citoquinas y en el Factor de Transcripción STAT1 .....	141
3.5 Efecto de Paliperidona en la Activación Microglial (Fenotipo M1/M2) .....	142
3.6 Efecto de Paliperidona en el Sistema Endocannabinoide .....	143
3.7 Efecto de Paliperidona en el Deterioro Cognitivo .....	144
3.8 Resumen de Resultados .....	145
4. ESTUDIO EN PACIENTES CON UN PRIMER EPISODIO PSICÓTICO .....	147
4.1 Resumen de Resultados .....	151

## **VI. DISCUSIÓN**

---

1. MODULACIÓN DE RISPERIDONA Y PALIPERIDONA EN LA NEUROINFLAMACIÓN .....	154
2. EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE .....	160
3. PAPEL DE LA PALIPERIDONA EN LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS ANTIINFLAMATORIOS/ANTIOXIDANTES .....	164
4. EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (ECS) .....	168
5. DISCUSIÓN GLOBAL, LIMITACIONES Y FORTALEZAS DE LOS ESTUDIOS, IDEAS DE FUTURO .....	172

## **VII. CONCLUSIONES**

---

1. CONCLUSIONES .....	178
-----------------------	-----

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

---

1. BIBLIOGRAFÍA .....	182
-----------------------	-----

## **IX. ANEXO**

---

1. ANEXO .....	206
----------------	-----

15d-PGJ <sub>2</sub> : 15-deoxi-prostaglandina J <sub>2</sub>	FLAMMPEP: Proyecto de alteraciones inflamatorias en primeros episodios psicóticos
2-AG: 2-araquidonil glicerol	FOLR2: Receptor de Folato 2
5-HT: Serotonina	GAF: Escala evaluación actividad global
ACTH: Hormona adrenocorticotropa	GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
AEA: Araquidonoil etanolamida, anandamida	GATA3: Factor de transcripción ( <i>GATA binding protein 3</i> )
AKT: Proteína quinasa B	GC: Glucocorticoides
ANOVA: Análisis de varianza	GM-CSF: Factor formador de colonias de granulocitos/macrófagos ( <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> )
AP1: Proteína activadora 1	GPx: Glutathion peroxidasa
ARE: Elemento de respuesta antioxidante ( <i>Antioxidant Response Element</i> )	Gram-: Gram negativas
ArgI: Arginasa tipo I	GSH: Glutathion
AU: Unidad arbitraria	HHA: Eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal
BHE: Barrera hematoencefálica	HMGB1: Grupo proteico de alta movilidad B1.
BMI: Índice de masa corporal	HO1: Hemo oxigenasa 1
BSA: Albúmina suero bovina	HSP: Proteínas de choque térmico ( <i>Heat shock proteins</i> )
CAT: Catalasa	i.p.: Intraperitoneal
CB1: Receptor de cannabinoide 1	i.v.: Intravenoso
CB2: Receptor de cannabinoide 2	IFN: Interferón
CD14: Cluster de diferenciación 14 ( <i>Cluster of differentiation 14</i> )	IgA: Inmunoglobulina A
CD36: Cluster de diferenciación 36 ( <i>Cluster of differentiation 36</i> )	IKK: Quinasa de IκB
CIBERSAM: Centro de Investigaciones Biomédicas en Red en Salud Mental	IL: Interleuquina
COX-2: Ciclooxygenasa 2	IL10: Interleuquina 10
CRH: Hormona liberadora de corticotropina	IL13: Interleuquina 13
CX3CL1: Fractalquina	IL1β: Interleuquina 1β
CX3CR1: Receptor de fractalquina	IL4: Interleuquina 4
DAGL: Diacilglicerol lipasa	IL6: Interleuquina 6
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño ( <i>damage-associated molecular patterns</i> )	iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
DEPC: Dietil-pirocarbonato	IRAK: Quinasa asociada al receptor de IL1 ( <i>Interleukin-1 receptor associated kinase</i> )
DNA: Ácido desoxirribonucleico	IRF: Factor de regulación del interferón
dNTP: Deoxinucleótidos trifostato	IκBα: Inhibidor del NFκB, α
DSM-IV: 4ª edición del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales	KEAP1: Proteína 1 asociada a proteína reguladora Kelch de <i>Drosophila</i> ( <i>Kelch-like ECH-Associated Protein 1</i> )
dsRNA: RNA de doble hebra	LBP: Proteína de unión a LPS ( <i>LPS binding protein</i> )
DUP: Duración de la psicosis sin tratar	LCR: Líquido cefalorraquídeo
EAAT: Transportadores de aminoácidos excitatorios	LPS: Lipopolisacárido
eCB: Endocannabinoides	M1: Activación microglial clásica, inflamatoria
ECS: Sistema Endocannabinoide	M2: Activación microglial alternativa, antiinflamatoria
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	MADRS: Escala de Depresión de Montgomery-Asberg
EIA: Método inmuno-enzimático de adsorción	MAGL: Monoacilglicerol lipasa
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima ( <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )	
FAAH: Amino hidrolasa de ácidos grasos	

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos  
M-CSF: Factor formador de colonias de macrófagos (*Macrophage colony-stimulating factor*)  
MD-2: Proteína de diferenciación mieloide 2 (*Myeloid differentiation 2 o lymphocyte antigen 96*)  
MDA: Malonildialdehído  
mRNA: RNA mensajero  
MyD88: Proteína de diferenciación mieloide 88 (*Myeloid differentiation 88*)  
NAPE: N-araquidonil-fosfatidiletanolamina  
NAPE-PLD: N-araquidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D  
NEMO: Modulador esencial de NFκB (*NFκB essential modifier*)  
NF-E2: Factor nuclear eritroide-2  
NFκB: Factor nuclear de transcripción *kappa B*  
NK: células NK (*Natural Killer*)  
NLR: Receptores de tipo NOD (*NOD-like receptor*)  
NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato  
NO: Óxido nítrico  
NOD: Dominio de oligomerización a nucleótidos  
NQO1: NADPH:quinona oxidorreductasa 1  
NRF2: Factor de transcripción 2 relacionado al factor NF-E2 (*NF-E2-Related Factor-2*)  
OEA: Oleiletanolamida  
**PALI**: Paliperidona  
PAMPS: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)  
PANSS: Escala de los síntomas positivos y negativos  
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Pheripheral blood mononuclear cells*)  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCP: Fenciclidina  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.  
PEA: Palmitoiletanolamida  
PEP: Primer episodio psicótico  
PFC: Corteza prefrontal  
PG: Prostaglandina  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa  
Poly(I:C): Ácido poliinosínico- policitidílico

PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.  
PPARγ: Receptores nucleares activados por los proliferadores de peroxisomas y  
PPRE: Elementos de respuesta a PPAR  
Prx1: Peroxirredoxina 1  
PTSD: Trastorno post-traumático  
RNA: Ácido ribonucleico  
ROS: Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)  
**RSP**: Risperidona  
SCID: Entrevista clínica estructurada para PTSD  
SEM/EEM: Error estándar de la media  
SNC: Sistema nervioso central  
SNS: Sistema nervioso simpático  
SOD: Superóxido dismutasa  
SQZ: Esquizofrenia  
SR: Receptores recogedores (*scavenger receptors*)  
STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)  
TAB: Proteínas de unión a TAK1  
TACE: Enzima convertidora de TNFα  
TAK1: Quinasa activada por TGFβ  
TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico  
TGFβ: Factor de crecimiento transformante β  
Th: Células T *helper* o T colaboradoras  
THC: Δ9-tetrahidrocanabinol  
TLR: Receptor tipo "Toll" (*Toll-like Receptor*)  
TNFR1: Receptor de TNFα 1  
TNFR2: Receptor de TNFα 2  
TNFα: Factor de necrosis tumoral α  
TRAF: Factor asociado al receptor de TNF  
Treg: Células T reguladoras  
TRIF: Activador de interferón asociado al receptor Toll  
TRPV1: Receptor vanilloide tipo 1  
WB: Western blot  
YMRS: Escala de manía de Young





# I. Resumen

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Las alteraciones en el sistema inmune innato y en la respuesta inflamatoria, ya sean causadas por factores endógenos o exógenos, han sido implicadas como un componente fundamental en la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas. Esto es de gran relevancia en la esquizofrenia, una enfermedad incurable de gran impacto socioeconómico que afecta al 1% de la población mundial, caracterizada por alteraciones en la neurotransmisión, cuyos tratamientos antipsicóticos sólo engloban parte de la sintomatología de la enfermedad, tienen importantes efectos adversos, y una gran proporción de los pacientes muestran resistencia al tratamiento y baja adherencia. Uno de los principales factores de riesgo ambiental de esta enfermedad es la exposición al estrés. El estrés es capaz de activar indirectamente, mediante el daño celular o la permisividad ante patógenos, uno de las principales agentes de la inmunidad innata, los receptores tipo Toll (TLR). TLR3 actúa principalmente como centinela frente a infecciones virales al reconocer las dobles hebras de RNA viral, en cambio, TLR4 detecta principalmente el LPS, un componente estructural de las paredes de bacterias Gram negativas. Además, ambos TLRs son capaces de detectar patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los principales coordinadores de la respuesta celular inmune son las citoquinas, las cuales inducen una respuesta Th1, Th2 o Th reguladora, también son las encargadas de activar la microglía en reposo, y una vez más son las que orquestan la polarización M1 o M2 según las citoquinas presentes en el ambiente. Por otro lado, el daño celular y la acumulación de mediadores proinflamatorios oxidativo/nitrosativos activan vías antioxidantes como la del factor NRF2, que a su vez también incide en la regulación de la activación microglial. Otro factor que interviene en el proceso, y que se relaciona directamente con la enfermedad es el sistema endocannabinoide.

Aún faltan por clarificar los mecanismos de acción de los antipsicóticos, pero sus efectos no se explican totalmente mediante sus acciones sobre las alteraciones en el sistema de neurotransmisión dopaminérgica o neuromoduladores de serotonina. Además, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que actúen

como adyuvantes en el tratamiento de esta enfermedad discapacitante. Estudios previos al inicio de esta Tesis, habían demostrado que varios antipsicóticos atípicos presentaban una respuesta anticitoquina *in vitro*, entre ellos risperidona, a partir de allí nos planteamos estudiar con mayor profundidad los posibles mecanismos pro/anti inflamatorios involucrados.

**Objetivos:** Investigar el posible efecto modulador de los antipsicóticos risperidona (RSP) y paliperidona (PALI) en la activación de las vías del TLR3/4 y la consecuente respuesta antiinflamatoria tanto a nivel central como periférico, y su participación en los mecanismos de respuesta frente al estímulo inflamatorio.

**Material y Métodos:** En primer lugar, se utilizó un modelo animal de neuroinflamación moderada inducido por LPS, un potente activador de la respuesta inflamatoria. Los antipsicóticos se administraron previamente al estímulo inflamatorio para observar su posible potencial antiinflamatorio/antioxidante. Una vez establecido el efecto modulador de estos antipsicóticos usamos un modelo neuroinflamatorio de estrés agudo/crónico para comprobar los efectos previamente observados bajo condiciones fisiológicamente parecidas al principal estímulo ambiental implicado en la esquizofrenia, además se exploraron posibles vías de activación de la inflamación y mecanismos compensatorios o de respuesta a la misma (vía antioxidante NRF2, activación microglial M2, sistema endocannabinoide). Con la finalidad de acercarnos más a la enfermedad se utilizó uno de los modelos animales más reciente que mejor representa la esquizofrenia, el de activación inmune prenatal, una vez que los animales presentaron comportamientos de tipo esquizoide en la pubertad, se procedió a administrar el antipsicótico durante 21 días, y nuevamente se analizaron las vías previamente estudiadas. Para observar la traslacionalidad de estos resultados recurrimos a estudiar diversos marcadores biológicos inflamatorios en una población de controles y pacientes con un primer episodio psicótico (PEP), y en ellos tratamos de observar el efecto del tratamiento RSP/PALI con respecto a cada uno de estos marcadores.

**Resultados:** Tanto RSP como PALI previenen el incremento de los parámetros inflamatorios inducidos por LPS (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, iNOS, COX-2, mPGES-1, PGE $_2$ , MDA

y nitritos), a su vez, estimulan la restauración de parámetros antiinflamatorios disminuidos tras la exposición a LPS (L-PGDS, 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$ ) en la corteza prefrontal; a nivel periférico las dosis bajas de antipsicótico previenen el aumento de alguno de los parámetros proinflamatorios estudiados, y restauran los niveles de PPAR $\gamma$ . Las dosis mayores inhibieron el aumento de los niveles de nitritos.

PALI previene la activación de las vías del TLR3/4 y el aumento de los parámetros proinflamatorios inducidos por los distintos protocolos de estrés y la activación inmune prenatal. A su vez, previene el aumento de la permeabilidad intestinal y la consiguiente traslocación bacteriana inducida por el estrés. Además previene la activación de la vía del TLR4 mediante agonistas endógenos como HSP70 y HMGB1. Por otro lado, paliperidona restaura los mecanismos compensatorios antiinflamatorios (L-PGDS, 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$ ) disminuidos por el estrés. PALI estimula la activación de la vía antioxidante dependiente de NRF2 en los modelos animales utilizados. Además, previene el aumento de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IFNs), mientras que promueve la transcripción de citoquinas antiinflamatorias (IL4, IL10 y TGF $\beta$ ) y restaura los niveles de mRNA de fractalquina, lo cual incide en la polarización microglial M2 que induce indirectamente paliperidona. En cuanto al sistema endocannabinoide (ECS), PALI induce el aumento de los niveles de los receptores CB1 y modula las alteraciones presentes en el metabolismo enzimático de AEA y 2-AG inducidos por estrés, y concretamente disminuye los niveles de las enzimas de degradación en el modelo animal de esquizofrenia. Además, PALI tiene la capacidad de mejorar el deterioro cognitivo inducido por la activación inmune prenatal en el modelo animal de esquizofrenia.

Finalmente, en los PEP se observó que a pesar del tratamiento antipsicótico, los marcadores proinflamatorios se encontraban elevados en la visita de seguimiento un año después del debut de la enfermedad. Pese a ser muy pocos los pacientes tratados con PALI, se observó que se prevenía el aumento de la actividad de NF $\kappa$ B y los niveles de peroxidación lipídica (TBARS). Por otro lado, al comparar la visita basal con el seguimiento, RSP presentó un aumento en los niveles proinflamatorios de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, y una disminución en los niveles de marcadores antiinflamatorios 15d-PGJ<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$ .

**Conclusiones:** Los resultados aquí expuestos sugieren un rol regulador de paliperidona en la activación de vías inmunes del TLR y la consecuente respuesta inflamatoria. Además, este antipsicótico atípico presenta un rol protector al inducir la activación de la vía antioxidante dependiente de NRF2 y estimular la polarización microglial M2. Por otro lado, paliperidona normaliza la diversidad de alteraciones observadas en el ECS.

Los mecanismos aquí estudiados, pueden presentar potenciales estrategias farmacológicas frente a la esquizofrenia y otras enfermedades psiquiátricas complejas.

## 2. ABSTRACT

**Background:** Alterations in the innate immune/inflammatory system, caused by endogenous or exogenous factors, have been proposed as key components in the pathophysiology of psychotic diseases. Schizophrenia is an incurable disease with great socioeconomic impact. Affects 1% of the world population, and it is characterized by alterations in neurotransmission. Antipsychotic treatments partially controls the symptomatology of the disease have significant side effects, and many patients show resistance to treatment and poor adherence. Stress exposure is a main environmental risk factor for psychiatric disease. The main agents of the innate immunity are the family of toll-like receptors (TLRs), which detect circulating pathogen-associated molecular patterns and endogenous damage-associated molecular patterns (DAMPs). TLR3 acts as sentinel against viral infection, recognizing viral RNA double strands. TLR-4 predominantly responds to lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria. Cytokines are the main coordinators of the cellular immune response; they can induce a Th1, Th2 or regulatory response. Cytokines are also responsible for activating the resting microglia, and orchestrate the polarization M1 or M2, depending the cytokines present in the environment. Furthermore, cell damage and accumulation of oxidative/nitrosative pro-inflammatory mediators activate antioxidant pathways such as NRF2-dependent, which also affects microglial activation. Another factor in the process, directly related to the disease is the endocannabinoid system.

The mechanism of action of antipsychotic drugs remains unclear, but their effects are not fully explained by its inhibitory action on the alterations of dopaminergic system or serotonin modulators. In addition, the search for new therapeutic strategies that act as adjuvants in the treatment of this disabling disease is necessary. Previous studies have shown that several atypical antipsychotics, including risperidone (RSP), presented an anti-cytokine effect in *in vitro* settings. So we considered exploring further potential pro/anti-inflammatory mechanisms involved.

**Aims:** This thesis aimed to investigate the possible regulatory effect of the antipsychotics RSP and paliperidone (PALI) in the activation pathway of TLR3/4, and the subsequent inflammatory response, in prefrontal cortex and periphery; as well as their participation in counterbalance mechanisms of response to inflammatory stimuli.

**Methods:** The first study was conducted in a model of mild neuroinflammation using a lipopolysaccharide (LPS) challenge. Antipsychotic drugs (RSP/PALI) were administered prior inflammatory stimulus to check whether they could block the inflammatory response. Once established the modulating effect of these antipsychotics, a neuroinflammatory model by acute/chronic stress was used to check previous antiinflammatory potential under a more similar pathophysiological inflammatory response to what can be found in schizophrenia, and also explore possible ways of inflammatory activation and compensatory mechanisms (antioxidant NRF2-mediated pathway, M2 microglial polarization and endocannabinoid system). In order to get closer to the disease, we use one of the animal models that better represents schizophrenia, by prenatal immune activation. Once the animals show schizophrenic-like behaviour at puberty, we proceeded to administer PALI during 21 days, and we analysed the whole inflammatory response previously studied. Finally, we analyzed several inflammatory biomarkers in a population of healthy controls and patients with a first psychotic episode (PEP). We look for a correlation between the treatment RSP/PALI and the biomarkers levels.

**Results:** Both RSP and PALI prevented the increase of inflammatory parameters induced by LPS (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, iNOS, COX-2, mPGES-1, PGE $_2$ , MDA and nitrites), and restored anti-inflammatory parameters decreased after LPS exposure (L-PGDS, 15d-

PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$ ) in prefrontal cortex. Peripherally, low doses of antipsychotic prevented increased of some pro-inflammatory markers, and restored the levels of PPAR $\gamma$ . Higher doses inhibited the increase in nitrite levels.

PALI prevented TLR3/4 activation, and the increment of pro-inflammatory parameters induced by acute/chronic stress or prenatal immune activation. Similarly, PALI prevented the increase of intestinal permeability and subsequent bacterial translocation induced by stress. It also prevented the activation of the TLR4 by endogenous agonists, like HSP70 and HMGB1. Moreover, PALI restored anti-inflammatory compensatory mechanisms (L-PGDS, 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$ ) decreased by stress. This antipsychotic drug activated the antioxidant NRF2-mediated pathway, prevented the increase of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IFNs; promote the transcription of anti-inflammatory cytokines (IL4, IL10 and TGF $\beta$ ); restores fractalkine mRNA levels; and contributes to M2 microglial activation. Regarding the endocannabinoid system (ECS), PALI increase protein CB1 levels, and modulated alterations in enzymatic metabolism of AEA and 2-AG induced by stress protocols. Also, on animal model of schizophrenia, PALI decreased the content of degrading enzymes of AEA and 2-AG, and improves cognitive impairment induced by prenatal immune activation.

Finally, in PEP was observed that despite the antipsychotic treatment, pro-inflammatory markers were elevated in the follow-up visit. Although very few patients were treated with PALI, we found an increased activity of NF $\kappa$ B and levels of lipid peroxidation (TBARS) were prevented. Furthermore, when comparing RSP baseline with follow-up, we registered an increase of pro-inflammatory COX-2 and PGE<sub>2</sub> levels, and decreased levels of anti-inflammatory markers 15d-PGJ<sub>2</sub> and PPAR $\gamma$ .

**Conclusions:** Our results showed a regulatory role of RSP/PALI in immune activation and inflammatory response. In addition, had a neuroprotective function by activating antioxidant NRF2-dependent pathway, and stimulated microglial polarization to M2 phenotype. Moreover, PALI normalized the diverse stress-induced alterations observed in the ECS.

The mechanisms studied here may be potential new pharmacological strategies against schizophrenia and other complex psychiatric illnesses.





## II. Introducción

## 1. EL ESTRÉS

### 1.1 GENERALIDADES.

En el primer mundo, junto con los revolucionarios avances de la medicina y la sanidad, también han cambiado nuestros patrones de enfermedad, es así como nuestras preocupaciones han dejado de posarse en las enfermedades derivadas de una mala nutrición, la falta de higiene o las infecciones. Hoy en día, las enfermedades que nos afligen son aquellas que nos provocan un daño lento y acumulativo. La percepción del concepto de “estrés” también ha evolucionado, y gracias a esto se han encontrado relaciones entre la biología y las emociones, estableciéndose una gran variedad de aspectos como la personalidad, los pensamientos y la forma de ser de cada individuo que influyen en el propio organismo. Es así como adquiere importancia la comprensión de que los trastornos emocionales extremos nos afectan negativamente y de lo cual se deriva que muchas de las enfermedades de acumulación lenta se pueden causar o agravar por el estrés.

En medicina se utiliza el término “estrés” desde que los pioneros Walter Cannon y Hans Selye, sentaran las bases del “Síndrome General de Adaptación”, donde el organismo hace un esfuerzo por adaptarse a una nueva situación (*Cannon, 1914, 1915; Selye, 1936*).

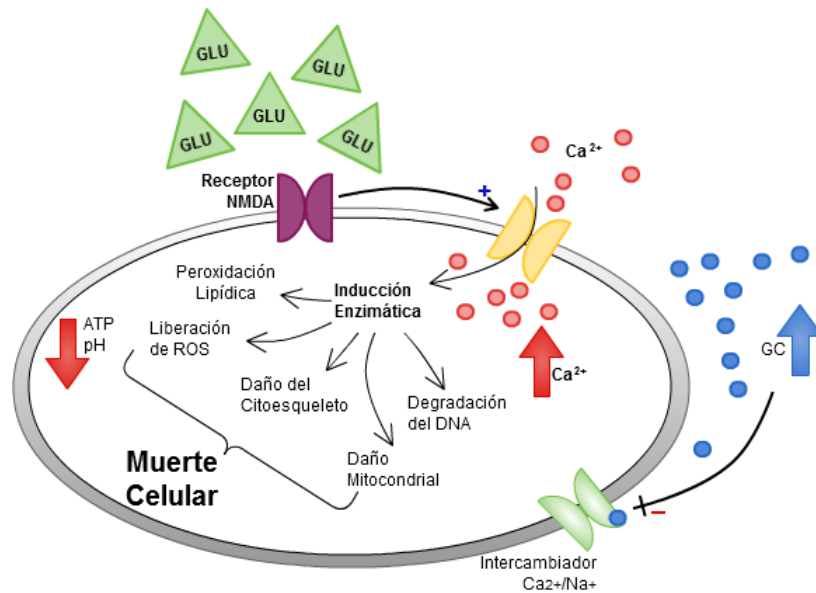
No existe una definición consensuada de estrés, pero una de las que mejor refleja la complejidad del concepto expone: “El estrés puede definirse como una amenaza real o imaginaria, a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo, que produce una respuesta psicológica y/o comportamental. En biomedicina, el estrés también se refiere a situaciones en las que los niveles de glucocorticoides de origen adrenal y las catecolaminas se encuentran elevados como consecuencia de una experiencia” (*McEwen, 2000*).

## 1.2. RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS: EJE HHA

En la respuesta al estrés actúan de manera conjunta la activación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA) y del sistema nervioso simpático (SNS).

Tras un estímulo estresante:

- Se activa el SNS, produciendo una liberación aguda de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), que preparan al organismo para la respuesta a estrés al desencadenar la respuesta estereotipada de “lucha-huida”.
- Por otro lado, cuando las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo se activan, secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el hipotálamo al sistema venoso portal, de esta manera CRH regula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la adenohipófisis. ACTH se libera al torrente sanguíneo, llegando a las glándulas adrenales donde actúa sobre las zonas *fasciculata* y *reticularis* de la corteza adrenal, estimulando la síntesis de glucocorticoides (GC) que serán secretados a la circulación sistémica. Mantener elevadas concentraciones de GC puede ser perjudicial, por lo que el eje se autorregula negativamente.
- Además, en el sistema nervioso central (SNC) se produce la liberación de aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato, alcanzando elevadas concentraciones extracelulares en la corteza cerebral, estriado, hipocampo y *nucleus accumbens* (Moghaddam, 1993). El glutamato liberado se une a su receptor ionotrópico tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), cuya sobreactivación aumenta la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma celular, que en exceso desencadena la excitotoxicidad, proceso que puede dañar e incluso inducir la muerte celular debido a la acumulación masiva de mediadores proinflamatorios y radicales libres, entre otros (Fig.1). Se ha observado que los GC pueden exacerbar la excitotoxicidad cuando su acción se mantiene en el tiempo, alterando las subunidades de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nair et al., 1998) e inhibiendo su recaptación a través de la  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPasa (Bhargava et al., 2000) y del intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  (rev. en McEwen y Sapolsky, 1995). También se ha demostrado, que los GC son capaces de inhibir la recaptación del glutamato en sinaptosomas (Leza et al., 1998) y que el estrés induce una disminución de la expresión de los recaptadores EAAT2 (astroglia) y EAAT3 (neurona) (Madrigal et al., 2003a).



**Figura 1.** Esquema descriptivo de los mecanismos moleculares por los que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induce neurotoxicidad y muerte celular. GLU: Glutamato; GC: Glucocorticoides.

Cuando el estímulo estresante es breve y controlado, la respuesta es beneficiosa para el organismo, contribuyendo al desarrollo intelectual y emocional del individuo (*eustress*) (rev. en Tafet y Bernardini, 2003). En cambio, cuando el estímulo es incontrolable, intenso y persiste en el tiempo, produce una respuesta adaptativa deficiente (*distress*) que puede desembocar en la aparición de numerosas patologías (Selye, 1976). El cerebro es el órgano más sensible a la pérdida de la homeostasis derivada de un estrés crónico, especialmente en áreas como la corteza prefrontal (PFC), donde se ha observado en ratas expuestas a estrés crónico la disminución de la densidad de espinas dendríticas, y atrofia las dendritas de las neuronas piramidales de las capas II y III (Cook y Wellman, 2004). Por otro lado, en sujetos que han sufrido estrés post-traumático (PTSD) se ha observado una disminución en el volumen del hipocampo (Lindauer et al., 2006). Diversos estudios clínicos y pre-clínicos han demostrado el deterioro cognitivo en procesos de aprendizaje, memoria, percepción presente en individuos sometidos a estrés (Alexander et al., 2007; Duncko et al., 2009; Bhojraj et al., 2010). Además, en la amígdala lateral, se ha observado una hipertrofia de las neuronas estrelladas bajo condiciones de estrés (Vyas et al., 2002).

### 1.3. ESTRÉS Y NEUROINFLAMACIÓN.

La activación del eje HHA induce en el SNC una respuesta de fase aguda semejante a la respuesta inflamatoria generada en un organismo en respuesta a una infección o traumatismo agudo. En ambas condiciones se produce activación glial, la barrera hematoencefálica (BHE) se deteriora pudiendo posibilitar el infiltrado de células inmunes periféricas, síntesis y liberación de citoquinas, factores nucleares, prostaglandinas, radicales libres, etc. (Lucas *et al.*, 2006). Curiosamente, la relación inversa también tiene lugar: la inflamación generada por una infección activa el eje HHA (a través de un aumento en los niveles plasmáticos de citoquinas como la IL1 $\beta$  o el TNF $\alpha$ ), actuando como un estímulo estresante (*rev. en Black y Garbutt, 2002*). Un proceso interesante que ilustra las relaciones existentes entre periferia y SNC se ha observado en pacientes con depresión, es el conocido como “leaky gut” (Maes *et al.*, 2008). La exposición a estrés desencadena un proceso inflamatorio en la periferia, capaz de inducir un aumento en la permeabilidad intestinal (Ponferrada *et al.*, 2007), permitiendo que bacterias o al menos parte de ellas pasen a la circulación sistémica. Las enterobacterias Gram negativas (Gram-) son la principal fuente de lipopolisacárido (LPS), un potente ligando endógeno de los receptores de inmunidad innata Toll-like 4 (TLR-4). TLR-4 también se expresa a nivel del SNC, induciéndose una reacción neuroinflamatoria en respuesta a los niveles elevados de LPS (Gárate *et al.*, 2011).

Cabe destacar que las “hormonas del estrés”, catecolaminas y glucocorticoides, tienen la capacidad de regular la neuroinflamación. Los efectos de los glucocorticoides son complejos y dependen de múltiples factores como la naturaleza del estímulo inflamatorio, su duración, los subtipos de receptores activados, el área cerebral implicada, etc. De esta forma, los glucocorticoides a niveles basales son inmunomoduladores, permitiendo la producción de citoquinas proinflamatorias en las primeras etapas del proceso inflamatorio, y posteriormente cambian a un patrón inmunosupresor, facilitando la liberación de citoquinas antiinflamatorias que promueve la resolución del proceso inflamatorio (Sorrells *et al.*, 2009). Además, tienen la capacidad de bloquear la activación de factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B, al inducir la expresión de su subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , previniendo su traslocación al núcleo. Aunque también se ha observado que en niveles elevados potencian la

activación de NFκB dependiente de lipopolisacárido (LPS) (*Munhoz et al., 2010*). Este comportamiento de los glucocorticoides es lo que se ha denominado como “paradoja glucocorticoidea”.

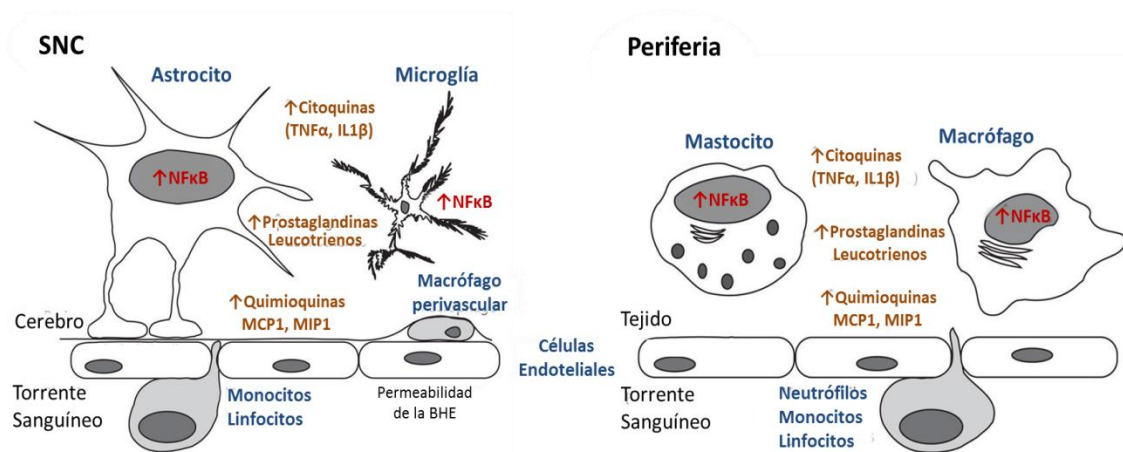
Por su parte, las catecolaminas juegan un papel inmunomodulador, potenciando el proceso inflamatorio, al estimular la secreción de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNFα) y la interleuquina 1β (IL1β), entre otros. Además se ha observado que tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmune innata celular en favor de la respuesta inmune humoral (*Varga et al., 2014*).

Se ha observado que en modelos animales sometidos a estrés por restricción de movimiento (situación donde los GC y las catecolaminas se encuentran elevados) se produce una liberación y acumulación de mediadores proinflamatorios, como citoquinas, factores nucleares, enzimas proinflamatorias, prostaglandinas, y mediadores de estrés oxido/nitrosativo (*Madrigal et al., 2001; 2003b*). Estos mediadores inducen una respuesta no específica conocida como “*Sickness behaviour*”, que se caracteriza por una activación del eje HHA, fiebre, somnolencia, letargia y anorexia (*rev. en Allan y Rothwell, 2003*).

### **1.3.1. CITOQUINAS:**

Las citoquinas son un grupo de proteínas bioactivas solubles, liberadas por diversos tipos celulares a nivel periférico (macrófagos y linfocitos como principales fuentes), a nivel central (astrocitos, microglía, neuronas), y por las células endoteliales (Fig.2). Su principal función es la comunicación intercelular, siendo capaces de alterar las células dianas que poseen receptores específicos de citoquinas en la membrana. Dentro de este amplio grupo encontramos las linfocinas (producidas por linfocitos), monocinas (producidas por monocitos/macrófagos), quimioquinas (tienen una función quimioatrayente principal), interleuquinas (IL, su efecto es pleiotrópico según la célula diana), interferones (IFN, su principal función es promover la respuesta antiviral) y factores estimuladores de colonias (su principal función es de diferenciación celular).

Además de las citoquinas sintetizadas en el propio SNC, éstas también pueden proceder de la periferia al traspasar la barrera hematoencefálica (BHE) por varios mecanismos: a través de regiones permeables, mediante transporte activo, por activación de células endoteliales y otros tipos celulares que revisten la vasculatura cerebral (que son inducidas a producir citoquinas y otros mediadores proinflamatorios), o bien por unión a los receptores de citoquinas asociados a las fibras nerviosas aferentes periféricas, que transmiten la señalización hacia las áreas cerebrales correspondientes (*rev. en Dantzer et al., 2008; Miller et al., 2009*). Además, recientemente se ha descubierto en ratones que el sistema linfático se comunica con el SNC mediante pequeños vasos linfáticos funcionales (*Louveau et al., 2015*). Independientemente del mecanismo por el que las citoquinas señalizan hacia el cerebro, tienen la capacidad de alterar numerosas respuestas fisiológicas y comportamentales en el SNC, como la regulación de la activación del eje HHA. Gran cantidad de estos mediadores participan en la regulación del proceso inflamatorio frente a estímulos infecciosos y/o estresantes (ya sean físico, psicológico o mixto). Entre las citoquinas proinflamatorias más importantes encontramos el  $\text{TNF}\alpha$ , la  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL6}$  e  $\text{IFN}\gamma$ .



**Figura 2.** Similitudes y diferencias entre la respuesta inflamatoria en el SNC y la periferia.  $\text{TNF}\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa;  $\text{IL1}\beta$ : Interleuquina 1 beta;  $\text{MCP1}$ : Proteína quimioatrayente de monocitos;  $\text{MIP1}$ : Proteína inflamatoria de macrófagos;  $\text{NF}\kappa\text{B}$ : Factor de transcripción nuclear  $\kappa\text{B}$ . (*Adaptado de Sorrells y Sapolsky, 2007*).

- **Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ):** Es el principal iniciador de la respuesta inflamatoria. En el SNC tiene tanto un papel homeostático como fisiopatológico (rev. en *Montgomery y Bowers, 2012*). Tras un estrés físico de corta duración (restricción del movimiento por 30 minutos) se produce un aumento en la actividad de la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE) en la corteza cerebral y por ende también aumentan los niveles de TNF $\alpha$  (*Madrigal et al., 2002a*), alcanzando un pico máximo a los 90 minutos (*Fukuda et al., 2005*). TNF $\alpha$  media sus efectos a través de dos receptores distintos, el de tipo 1 (TNFR1) y el de tipo 2 (TNFR2), los cuales utilizan vías de señalización distintas. La activación del receptor TNFR1 promueve la traslocación del NF $\kappa$ B al núcleo, y se relaciona con los efectos citotóxicos y apoptóticos del TNF $\alpha$ . Por otro lado, TNFR2 se relaciona principalmente con la supervivencia y proliferación celular. Niveles suprafisiológicos de TNF $\alpha$ , independiente del estímulo inflamatorio, inhiben los recaptadores de glutamato, aumentando los niveles de glutamato extracelular en el SNC, lo cual induce neurotoxicidad derivada de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (rev. en *Olmos y Lladó, 2014*).

- **Interleuquina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ):** Su principal productor son los macrófagos, pero también es secretada por otras células ante diversos estímulos incluyendo LPS, otras citoquinas e incluso por autoinducción. Necesita del procesamiento proteolítico por parte de caspasa 1 para ser activa. Regula la producción de catecolaminas y GC, y se ha implicado en los déficit cognitivos y síntomas depresivos inducidos por estrés (rev. en *Maier y Watkins, 1998*). Por otro lado, tiene un rol fundamental en el crecimiento y diferenciación de las poblaciones linfocitarias TCD4+. Se ha relacionado un aumento en los niveles de esta citoquina con la aparición de enfermedades autoinflamatorias, las cuales se caracterizan por presentar un episodio inflamatorio agudo recurrente de duración variable sin una causa neoplásica, infecciosa o inmune (ej. Síndrome de Majeed) (rev. en *Masters et al., 2009*).

- **Interleuquina 6 (IL6):** es producida tanto por células del sistema inmune como no inmunes (endoteliales y fibroblastos, entre otras). Su secreción se induce por la IL1 $\beta$ , y además, se incrementan sus niveles en respuesta al TNF $\alpha$ ; por lo que se considera como el producto final en la cascada de citoquinas responsable de la hipertermia (*Chai et al., 1996*). A diferencia de otras citoquinas, IL6 tiene una naturaleza dual, es decir, presenta tanto actividad proinflamatoria (mediada



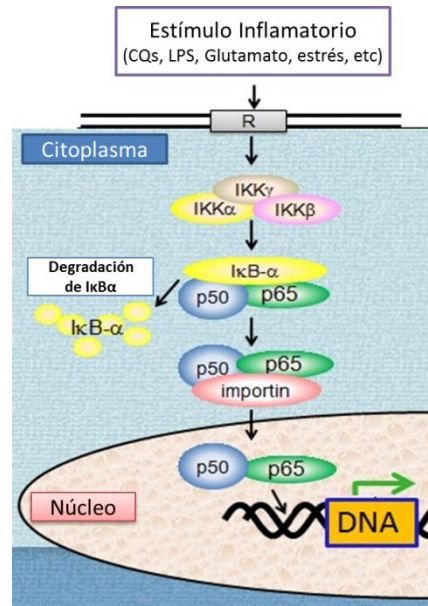
principalmente por su receptor soluble, sIL-6R) como antiinflamatoria (mediada por su receptor de membrana, IL6R) (Scheller *et al.*, 2011).

Otra citoquina importante que juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria es el interferón *gamma* (IFN $\gamma$ ), la producen los linfocitos T y las células NK. IFN $\gamma$  es un potente inductor de la expresión génica de TNF $\alpha$  en microglía (Mangano *et al.*, 2012), y participa en la activación de los macrófagos.

### 1.3.2. FACTOR NUCLEAR DE TRANSCRIPCIÓN *kappa* B (NF $\kappa$ B):

NF $\kappa$ B es un complejo proteico ubicuo que regula la transcripción del DNA, teniendo un papel clave en la reacción inflamatoria de la función inmunitaria. Una gran variedad de estímulos son capaces de activar su vía, entre ellos el estrés, las citoquinas y los antígenos bacterianos y virales (Madrigal *et al.*, 2001).

La familia NF $\kappa$ B la integran 5 proteínas, las cuales se unen formando heterodímeros. La conformación más abundante está dada por la unión de subunidades p50 y p65. En condiciones basales, NF $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma de manera inactiva, debido a que permanece unido a una subunidad inhibitoria, I $\kappa$ B, de ellas la principal y más estudiada es la subunidad  $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ . Bajo condiciones inflamatorias, se desencadena una cascada de señalización intracelular que activará a la quinasa I $\kappa$ B (IKK), la cual fosforilará a I $\kappa$ B $\alpha$ , induciendo su degradación y dejando libre a NF $\kappa$ B, el cual gracias a la interacción con importinas, como la  $\alpha$ 3 y la  $\alpha$ 4 (Fagerlund *et al.*, 2005), trasloca al núcleo donde se une a regiones específicas del DNA (elementos promotores  $\kappa$ B) e induce la transcripción de genes específicos (Fig.3). Algunos de dichos genes codifican para proteínas que contribuyen a la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos e inflamatorios como la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o la isoforma 2 de la ciclooxigenasa (COX-2) (rev. en Perkins, 2007).



**Figura 3.** Representación esquemática de la vía de activación canónica del NFκB. CQs: Citoquinas.

### 1.3.3. ENZIMAS DEPENDIENTES DE LA VÍA DEL NFκB:

- **Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS):** iNOS es la isoforma inducible de las tres isoformas de sintasas de óxido nítrico existentes. El óxido nítrico (NO) es un gas difusible y muy reactivo, que en el lecho vascular promueve la dilatación de los vasos sanguíneos, en las neuronas actúa como mensajero y en el sistema inmune es producido por los macrófagos para destruir los microorganismos que han sido fagocitados. Bajo condiciones de estrés se produce un aumento excesivo en la actividad de iNOS y como resultado se produce una acumulación de NO que reacciona con especies oxidativas como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), uno de los principales responsables del estrés oxidativo. Así se desencadena el proceso citotóxico de peroxidación lipídica, el cual destruye las membranas plasmáticas celulares, liberando otro producto tóxico conocido como malondialdehído (MDA) (Olivenza et al., 2000).

- **Ciclooxigenasa 2 (COX-2):** Las ciclooxigenasas producen prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico, que actúan en la respuesta inflamatoria (Fig.4). COX-2 tiene una tasa de formación de prostaglandinas  $PGE_2$  o  $PGD_2$  superior que la isoforma constitutiva, COX-1. Si bien COX-2 es inducible, en ciertas áreas cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala su expresión es constitutiva (Hoffman

*et al., 2000*). El aumento coordinado de la expresión de COX-2 y de la isoforma microsomal de la sintasa PGE<sub>2</sub> (mPGES-1) generan una producción elevada de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub>, la cual es capaz de inducir una liberación masiva de glutamato, pudiendo promover la muerte apoptótica de los astrocitos y estrés oxidativo (*Takadera et al., 2002*).

#### 1.4. MEDIADORES ANTIINFLAMATORIOS:

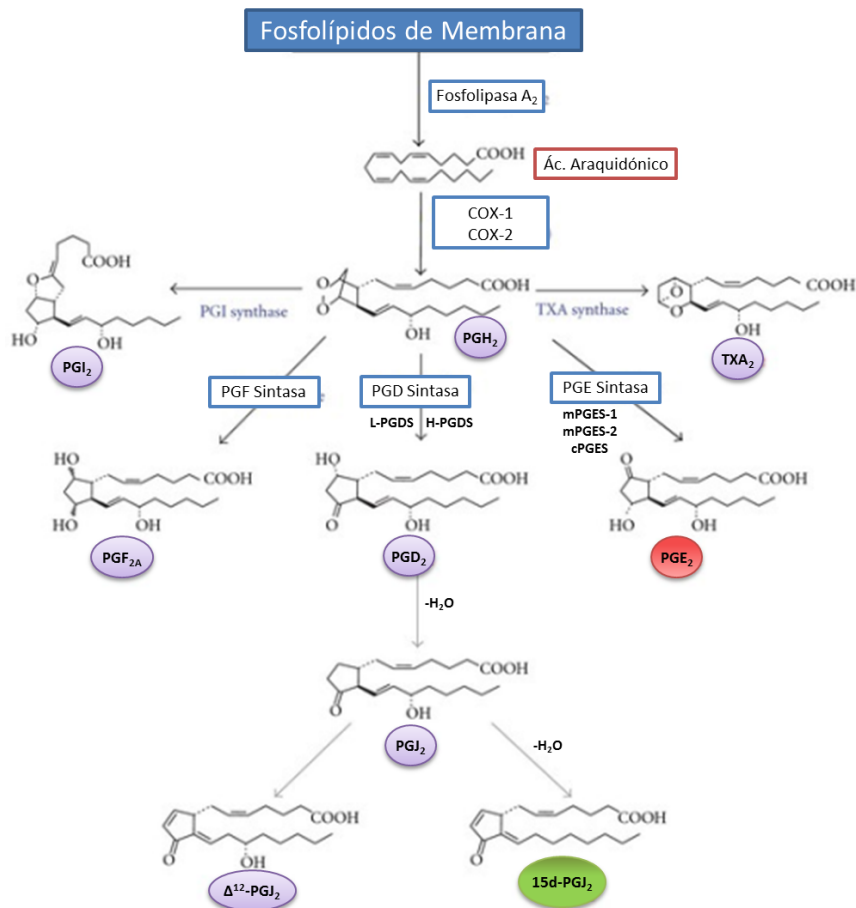
Para controlar el proceso neuroinflamatorio inducido por causa de estímulos estresantes, físicos o infecciosos, existe una variedad de mecanismos antiinflamatorios/antioxidantes que buscan reestablecer la homeostasis. En los últimos años, ha despertado especial interés un mecanismo desencadenado por COX-2, que en un mecanismo compensatorio, favorece la formación de la prostaglandina antiinflamatoria 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que bajo condiciones de estrés, se promueve la producción de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub>, ligando endógeno de los receptores nucleares, conocidos como receptores activados por los proliferadores de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (*García-Bueno et al., 2005a, b*).

##### 1.4.1. 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$ :

Las prostaglandinas regulan una amplia variedad de efectos fisiológicos y, por otro lado, se sintetizan y liberan en grandes cantidades en respuesta a diversos estímulos inmunes/inflamatorios.

En particular, 15d-PGJ<sub>2</sub> es un metabolito no enzimático de la prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) que es considerada como la prototípica prostaglandina antiinflamatoria (Fig.4).

No se ha identificado ningún receptor de membrana específico, pero tiene diversas dianas intracelulares, entre ellas el receptor nuclear PPAR $\gamma$  y el factor de transcripción nuclear NRF2 (Factor de transcripción 2 relacionado al factor NF-E2).

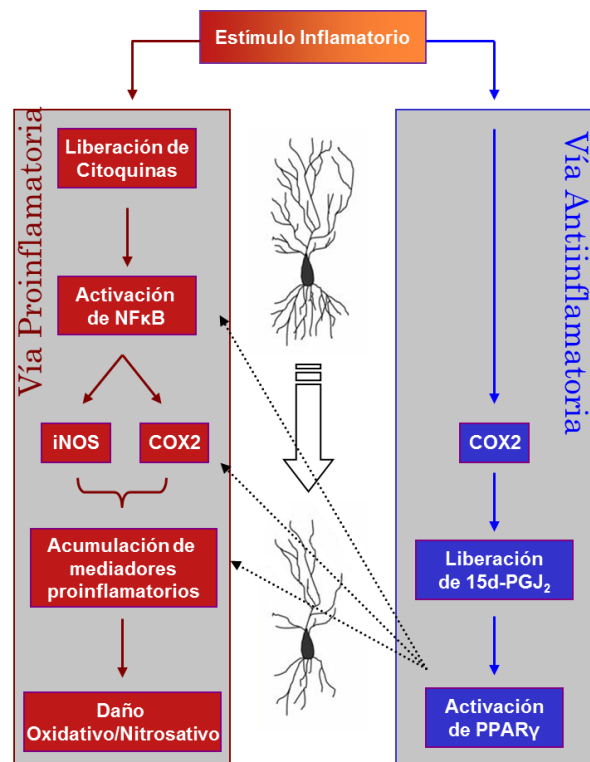


**Figura 4.** Esquema de síntesis de las distintas prostaglandinas. PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina I<sub>2</sub>/Prostaciclina; TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>; PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>; PGF<sub>2A</sub>: Prostaglandina F<sub>2A</sub>; PGD<sub>2</sub>: Prostaglandina D<sub>2</sub>.

La 15d-PGJ<sub>2</sub> se une covalentemente a proteínas, como la IKK, impidiéndole fosforilar a IκBα, con lo cual NFκB se mantiene inactivo en el citoplasma (Rossi *et al.*, 2000). También es capaz de inhibir directamente la unión de NFκB al DNA, por alquilación de un residuo de cisteína localizado en el dominio de unión a DNA del NFκB (Straus *et al.*, 2000). Por otro lado, puede unirse y activar a los receptores PPARγ, inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios dependientes de NFκB y de otros factores nucleares (Fig.5).

Los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs) son una familia de receptores para hormonas, que actúan como factores de transcripción regulando la expresión de diversos genes, entre ellos los relacionados con la diferenciación celular y el proceso inflamatorio. La isoforma más estudiada es PPARγ, y su ligando endógeno mejor descrito es la 15d-PGJ<sub>2</sub>. La activación de esta vía

antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$  se regula a través de las catecolaminas, los GCs y el glutamato en situaciones de estrés (García-Bueno *et al.*, 2008a).



**Figura 5.** Esquema de las vías proinflamatoria y antiinflamatoria activadas por un estímulo inflamatorio en el cerebro (*adaptado de García-Bueno y Leza, 2008b*). Línea continua, estimulación; línea punteada, inhibición.

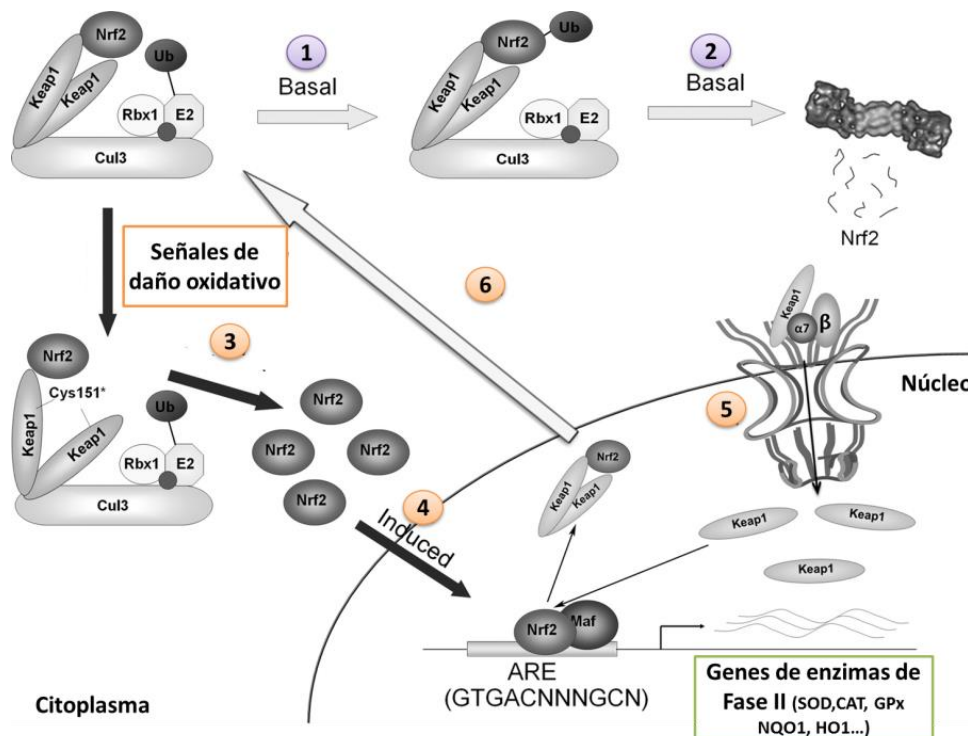
Bajo condiciones de estrés, la activación de esta vía, ya sea por ligandos endógenos o exógenos de PPAR $\gamma$ , previene la acumulación de mediadores oxido/nitrosativos en la corteza prefrontal de la rata (García-Bueno *et al.*, 2005b).

#### 1.4.2. 15d-PGJ<sub>2</sub>/NRF2:

El factor de transcripción nuclear NRF2 se conoce por su importante papel en la regulación de la respuesta antioxidante frente a estímulos de daño oxidativo, pero últimamente se ha descubierto que también contribuye a la respuesta antiinflamatoria (Gong *et al.*, 2002).

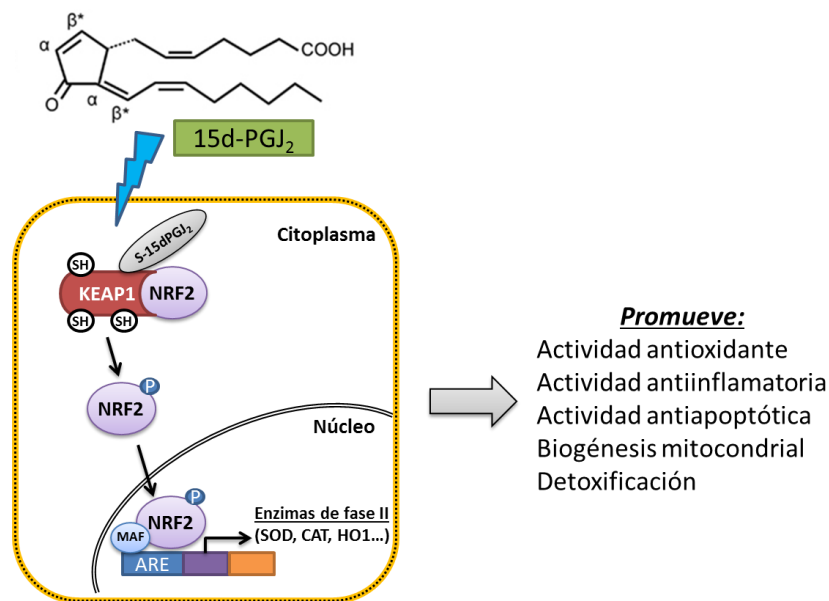
En condiciones normales, la activación de la vía del NRF2 se produce por estímulos de estrés oxidativo (ej. radicales libres, proteínas oxidadas, peroxidación lipídica, etc) que señalizan intracelularmente mediante vías de kinasas, siendo entre

ellas la más común la de PI3K/AKT (Fosfatidilinositol 3-quinasa/Proteína kinasa B) (Lee *et al.*, 2012). NRF2 es inactivo en el citoplasma por el acoplamiento de una proteína inhibidora, KEAP1 (del inglés *Kelch-like ECH-associated protein 1*), que actúa como substrato adaptador para la ubiquitinación y posterior degradación de NRF2 mediante proteosomas. Cuando la célula experimenta estrés oxidativo o por acción de moléculas electrófilas, los residuos de cisteína de KEAP1 son modificados, generando un cambio conformacional en la proteína que libera al factor NRF2, éste se acumula en el citoplasma y cuando es fosforilado trasloca al núcleo donde, junto con el factor de transcripción MAF, se unirá a secuencias específicas de DNA conocidas como elementos de respuesta antioxidante (ARE), que codifican para una amplia variedad de enzimas antioxidantes de fase II (Superóxido dismutasa, SOD; Catalasa, CAT; Glutathion peroxidasa, GPx; Hemo Oxigenasa 1, HO1, entre otras), entre otros productos (rev. en Vriend y Reiter, 2015) (Fig.6).



**Figura 6.** Esquema representativo de la vía del NRF2. 1) Condición basal inactiva de NRF2 asociado al complejo Cul3/Rbx1-E3 ubiquitin ligasa. 2) En reposo NRF2 tiene un proceso activo de degradación. 3) Liberación de NRF2 por cambio conformacional en KEAP1. 4) NRF2 trasloca al núcleo y se une a secuencias ARE. 5) Transporte nuclear de KEAP1 para inactivar NRF2. 6) NRF2 inactivo se transporta al citoplasma. Ub: ubiquitinación; MAF: proteínas pequeñas MAF. (Adaptado de Sun *et al.*, 2011).

No se ha dilucidado completamente el mecanismo de acción de 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre NRF2, pero se ha observado que es capaz de unirse a KEAP1 (Oh *et al.*, 2008), y que mutaciones en residuos de cisteína en dominios específicos de KEAP1 previenen la unión a NRF2 (Hosoya *et al.*, 2005). Se cree que 15d-PGJ<sub>2</sub> actuaría rompiendo la unión KEAP1/NRF2, lo que permitiría a NRF2 traslocar al núcleo, uniéndose a las secuencias ARE, induciendo la transcripción de secuencias para enzimas con actividad antiinflamatoria como hemo oxigenasa-1 (HO1) que promueve la generación de monóxido de carbono, capaz de inhibir a TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y otras proteínas proinflamatorias, a la vez que promueve la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL10 (Otterbein *et al.*, 2000; Drechsler *et al.*, 2006) (Fig.7). Otra enzima cuya síntesis se induce es la peroxirredoxina 1 (Prx1), que inhibe el factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), evitando el reclutamiento de células inflamatorias (Jung *et al.*, 2001). Se ha observado que en ratones deficientes de NRF2 la inflamación persiste y el reclutamiento de macrófagos que acumulan 15d-PGJ<sub>2</sub> se retrasa (Itoh *et al.*, 2004).



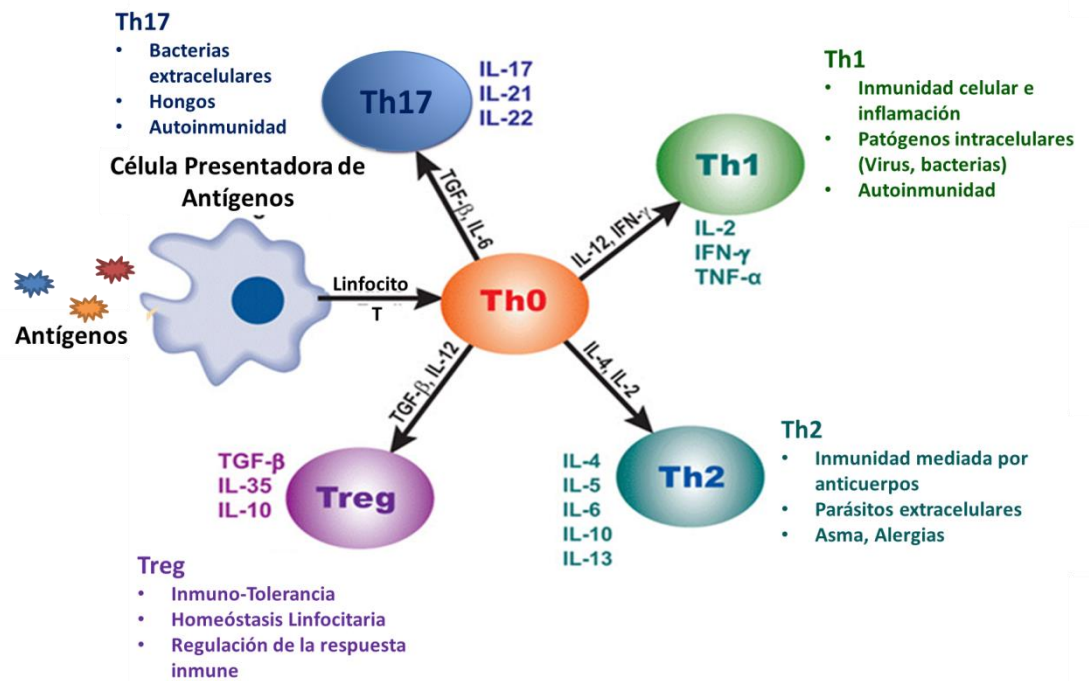
**Figura 7.** Esquema de la interacción entre 15d-PGJ<sub>2</sub> y NRF2. P: fosfato; SH: grupos sulfidrilos; MAF: proteínas pequeñas MAF; ARE: elementos de respuesta antioxidante.

## 2 ESTRÉS Y SISTEMA INMUNE

Durante años, el cerebro fue considerado como un órgano inmuno privilegiado, que carecía de drenaje linfático y que se mantenía aislado de la periferia debido a una muy selectiva permeabilidad de la barrera hemato encefálica (BHE). En las últimas dos décadas, este dogma ha ido cambiando considerablemente, gracias a los avances en el campo de la inmunología. Hoy en día, poseemos un mejor entendimiento de los procesos inmunes que tienen lugar en el cerebro en condiciones basales de reposo y en la enfermedad. Lo que nos ha llevado al estudio de estos procesos en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas.

Periodos cortos de estrés (de minutos a pocas horas) son necesarios para el desarrollo y maduración del sistema inmune, debido a que se induce la activación de respuestas inmunológicas innatas y adaptativas (*rev. en Dhabhar, 2014*). Procesos como el tráfico linfocitario y de otras poblaciones celulares, su crecimiento, maduración y activación son orquestados por las citoquinas presentes en el medio. Al contrario, una exposición crónica al estrés desregula las respuestas inmune porque se altera el balance de citoquinas entre las de tipo 1 (producidas por Th1, inflamatorias, promueven la respuesta inmune celular), y las de tipo 2 (producidas por Th2, promueven la respuesta inmune humoral) (*Xiang et al., 2012*) (Fig.8). El estrés crónico también puede aumentar la susceptibilidad del organismo a desarrollar otras enfermedades (como algunos tipos de cáncer) al suprimir la respuesta inmune celular inflamatoria Th1 y favorecer la respuesta de inmuno-tolerancia producida por los linfocitos T reguladores (Treg) (*Chida et al., 2008*). De igual manera, la exacerbación de la respuesta inmune, puede desencadenar una desregulación que a largo plazo puede generar patologías con un importante componente inflamatorio (ej. dermatitis, gingivitis) e incluso autoinmune (ej. esclerosis múltiple, psoriasis) (*Al'Abadie et al., 1994; Ackerman et al., 2002*)





**Figura 8.** Esquema representativo de la diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos TCD4. Sobre las flechas las principales citoquinas implicadas en su diferenciación y a un costado las principales citoquinas secretadas por cada subpoblación.

Por otro lado, la inmunidad innata también se ve afectada por el estrés y tiene especial relevancia en el SNC.

## 2.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE INNATO

Un estímulo inflamatorio persistente ya sea exógeno (ej. patógenos) o endógeno (ej. agregados proteicos), es percibido por el sistema inmune como señal de “daño” o “infección”. En la inmunidad innata, el reconocimiento de dichas señales se lleva a cabo principalmente mediante los receptores Toll-like (TLRs). Actualmente, se han identificado 13 tipos de TLR en mamíferos, 10 de ellos se expresan en humano, y 12 en ratones (*rev. en Brown et al., 2011*).

En mamíferos, los TLRs reconocen una amplia variedad de estructuras muy conservadas que se localizan en los microorganismos patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (*rev. en Takeda et al., 2003*), aunque también son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño

(DAMPs) (*Seong y Matzinger, 2004*), ligandos endógenos que se liberan como consecuencia del daño tisular, muerte celular, necrosis o remodelado tisular.

Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I. Se dividen en dos subgrupos basados en su localización celular, el primer grupo localizado en la superficie de la membrana celular comprende a los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 11. La función de estos TLRs se basa principalmente en el reconocimiento de componentes de membrana como glicolípidos, lipopéptidos y flagelinas de bacterias, hongos y parásitos. El segundo grupo se localiza en compartimientos intracelulares (retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas) y comprende los TLRs 3, 7, 8, 9 y 10; su función se basa principalmente en la detección de ácidos nucleicos de patógenos y en especial de virus (*Akira et al., 2006*) (Fig.8).

TLR4 fue el primer receptor Toll-like descrito en humanos y el mejor estudiado en mamíferos. Reconoce principalmente el lipopolisacárido (LPS), componente estructural de las membranas de las bacterias Gram negativas, pero también identifica otros ligandos de virus, hongos y micoplasmas. En cuanto a los ligandos endógenos, reconoce fosfolípidos oxidados, proteínas de choque térmico (HSPs), el grupo proteico de alta movilidad B1 (HMGB1), heparin sulfato, entre otros, liberados durante daño tisular o una intensa respuesta inflamatoria (*rev. en Piccinini y Midwood, 2010*).

Por su parte, el TLR3 actúa como centinela en las infecciones virales, reconociendo las dobles hebras de RNA viral (*Zhang et al., 2013*)

En el SNC, tanto el TLR3 como el TLR4 se expresan en microglía, astrocitos, oligodendrocitos, neuronas y otros sitios asociados a la vasculatura (*Okun et al., 2011*).

### **2.1.1. Vía de Señalización del TLR4 y TLR3**

Cuando TLR-4 se une a su ligando, se pueden activar distintas vías de señalización celular. La vía clásica, es la vía dependiente de MyD88 (*Myeloid differentiation 88*), y la vía alternativa es la TRIF-dependiente (Activador de interferón asociado al receptor toll). En el caso del TLR3, su activación se da sólo por la vía dependiente de TRIF.

Cuando las bacterias Gram negativas entran en el organismo son atacadas por diversos mecanismos del sistema inmune innato (ej. Sistema del complemento), cuando fragmentos de su pared bacteriana (LPS) quedan libres se acopla a ellos la proteína LBP (*LPS binding protein*), este agregado proteico se une al complejo formado

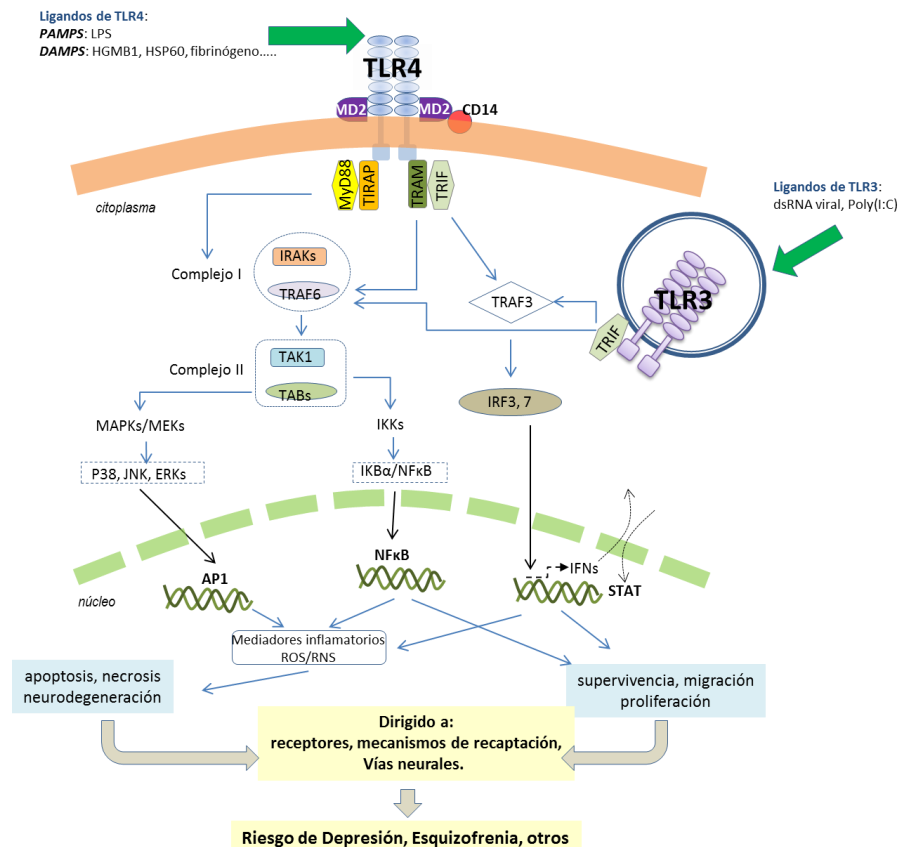
por CD14 (*cluster of differentiation 14*), MD2 (*myeloid differentiation factor-2*) y TLR4, necesario para que TLR4 reconozca el LPS. MD-2 además de intervenir en el reconocimiento de LPS, facilita la activación del TLR4 (*Miyake et al., 2002*).

- **Vía dependiente de MyD88:** Una vez reconocido el LPS, el dominio TIR citoplasmático de TLR4 se une a MyD88, una proteína adaptadora que desencadena una cascada de señalización intracelular. MyD88 recluta a IRAK4, una quinasa que a su vez recluta y activa TRAF6 (factor asociado al receptor de TNF). El complejo se disocia del TLR4 y una vez libre se une a TAK1 (Quinasa asociada a TNF $\alpha$ ), que con TAB1, 2 y 3 (Proteínas unidas a TAK) forman un complejo que produce la fosforilación de varios componentes induciendo la activación de dos posibles vías. La principal es que TAK1 fosforila IKK que inducirá la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , liberando NF $\kappa$ B, el cual traslocará al núcleo e inducirá la expresión de un conjunto de genes proinflamatorios (iNOS, COX2, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, entre otros) (Fig.9). Por otro lado, TRAF puede activar las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) mediante fosforilación (ERK, p38, JNK), que regulan a su vez otro factor de transcripción nuclear, AP1 (proteína activadora 1) (*rev. en Kaway y Akira, 2010; Plotnikov et al., 2011*)

- **Vía dependiente de TRIF:** En esta vía tienen relevancia dos moléculas adaptadoras, TRAM (Molécula asociada al receptor Toll) y TRIF (Activador de interferón asociado al receptor Toll).

Al igual que en la vía anterior se puede activar la vía del NF $\kappa$ B mediante la formación del heterodímero TRAM-TRIF que activan TRAF6. Por otro lado, se puede formar un homodímero TRIF-TRIF que interactúa con TRAF3, la cual recluta las quinasas IKK, TBK1 que en conjunto con NEMO, promueven la fosforilación del factor de regulación del interferón, IRF3, el cual trasloca al núcleo, donde induce la expresión de genes relacionada con la síntesis de Interferón de tipo I (IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ), caspasas y moléculas coestimuladoras (Fig.9) (*rev. en Kawasaki y Kaway 2014*).

A su vez IFN, actúa sobre sus propios receptores de membrana activando la vía STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). STAT1 se encarga de la regulación de los diferentes IFNs, al formar homodímeros o heterodímeros con STAT3 estimula la respuesta por IFNs tipo I (*rev. en Ivashkiv y Donlin, 2014*).



**Figura 9.** Esquema representativo la localización de los receptores TLRs y sus principales vías de señalización.

La activación de estas vías es controlada por diversas moléculas, que inducen una respuesta apropiada balanceando la producción de citoquinas proinflamatorias y de interferones de tipo I.

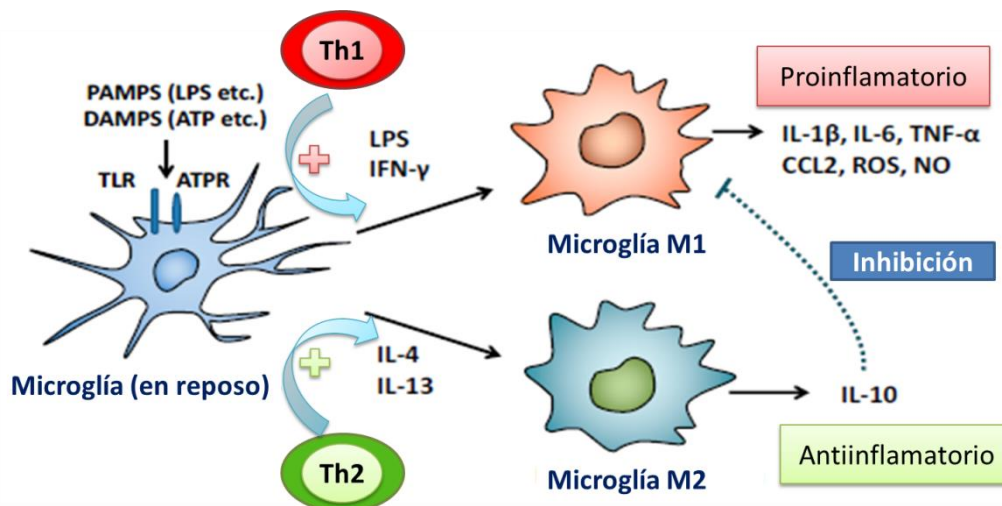
### 2.1.2. ACTIVACIÓN MICROGLIAL:

La microglía es la célula inmune innata residente del cerebro y constituye entre el 5 al 12% de la población celular total del cerebro. En condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en reposo no mostrando ninguna polarización o fenotipo especial, a pesar de producir factores neurotróficos y antiinflamatorios (*rev. en Streit, 2002*).

Frente a un estímulo de daño (PAMPs, DAMPs), incluyendo el estrés, la microglía se activa principalmente mediante el reconocimiento antigénico por parte de los receptores de la inmunidad innata, siendo los más importantes la familia de los TLRs, aunque también se activan por acción de los receptores NOD-like (NLRs, actúan como

sensores intracelulares de PAMPs) y los receptores recogedores (“scavengers”, SR, reconocen lipoproteínas modificadas por oxidación o acetilación, y también reconoce algunos PAMPs), al activarse se desencadenan las vías de señalización antes descritas, teniendo por finalidad producir una gran cantidad de mediadores inflamatorios ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL6}$ ,  $\text{IFN}\gamma$  y quimioquinas, entre otros) y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (rev. en Ransohoff y Brown, 2012). Dichas citoquinas son esenciales para que se produzca la activación clásica de la microglía, polarizando hacia un perfil proinflamatorio o M1. La población Th1 también juega un papel importante al secretar  $\text{IFN}\gamma$ , necesario para llevar a cabo este proceso. En condiciones normales es una respuesta muy controlada que busca fagocitar el patógeno o los residuos celulares presentes en el tejido (Scott, 1991; Ghadimi et al., 2010).

En contraste a la microglía M1, estas células pueden sufrir una activación alternativa, que genera una polarización antiinflamatoria o M2, dichas células expresan citoquinas y receptores implicados en la inhibición de la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis (Fig.10). En este caso es la subpoblación linfocitaria Th2 se relaciona con el fenotipo M2, debido a que la secreción de  $\text{IL4}$  estimula dicha polarización (Stein et al., 1992; rev. en Gordon y Martínez, 2010).



**Figura 10.** Esquema representativo de la polarización M1/M2 de la microglía. ATPR: Receptor de ATP; CCL2: quimioquina/MCP1 (proteína atrayente de monocitos); ROS: especies reactivas de oxígeno. (Adaptado de Nakagawa y Chiba, 2014).

Dentro de la población de M2 se pueden identificar subgrupos celulares con diferentes funciones. La división de estas poblaciones se basa en la caracterización de las citoquinas que secretan y por las que son estimuladas, además de la presencia de marcadores celulares representativos de cada subgrupo.

- **Microglía M2a:** Las citoquinas IL4 e IL13 pueden inducir la activación alternativa de la microglía, que expresan altos niveles de Arginasa I (ArgI), además de los marcadores de membrana CD36, CD163 y CD206. Por otro lado, secretan la citoquina antiinflamatoria IL10 al medio, la cual tiene la capacidad de inhibir la subpoblación M1, y por ende la inflamación (Fig.11) (*Stein et al., 1992; Taylor et al., 2005*).

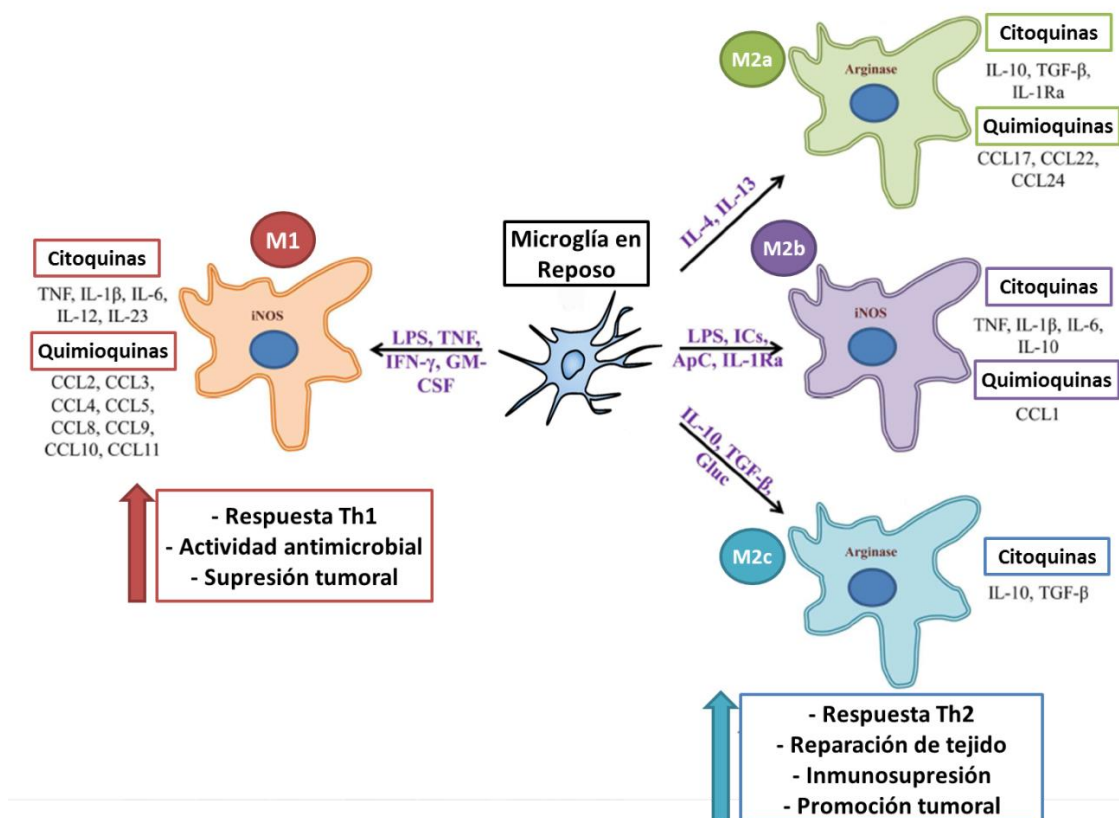
- **Microglía M2b:** Este subtipo de microglía no poseen altos niveles de ArgI, sino que expresan iNOS, por lo que recuerdan más bien un fenotipo M1 que M2. Sin embargo, secretan altos niveles de IL10. Además, poseen altos niveles de MHCII (Complejo mayor de histocompatibilidad) y de CD86, lo que sugiere que aún mantiene la habilidad de estimular las poblaciones linfocitarias. Se cree que este subtipo puede ser un regulador o iniciador de la polarización M2 (Fig.11) (*Mantovani et al., 2004; Edwards et al., 2006*).

- **Microglía M2c:** Otra forma de activación alternativa es la que inducen las citoquinas antiinflamatorias IL10 y TGF $\beta$ , además de los GCs. Las células microgliales pertenecientes a este grupo también presentan altos niveles de ArgI y liberan IL10 y TGF $\beta$ , pero su función principal se relaciona con el remodelamiento tisular (Fig.11) (*Mantovani et al., 2004; Martínez et al., 2008*).

El marcador de M2 más utilizado en los últimos años es la Arginasa 1 (ArgI), que es una enzima inducible que se localiza en el citoplasma. Compite con las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) por el substrato arginina, por lo que la producción de NO mediante iNOS se ve disminuida (*Munder et al., 1999*). Sustancias exógenas que estimulan la expresión de ArgI, han mostrado tener un efecto neuroprotector frente a la neurodegeneración inducida por LPS e IFN $\gamma$  (*Kiyofuji et al., 2015*).

Otro marcador M2 que se ha estado estudiando en tumores es el receptor de folato 2 (FOLR2). En el 2009, se observó que el receptor se expresaba macrófagos generados en presencia de M-CSF (M2), pero no en aquellos expuestos a GM-CSF (M1) (*Puig-Kröger et al., 2009*). El aumento en la captación de folato por los macrófagos

estimulados con M-CSF promueve el mantenimiento de altos niveles de IL-4, lo cual previene una polarización M1 y promueven la M2. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la expresión del FOLR2 se da en macrófagos asociados a tumores, los cuales exhiben un perfil funcional de tipo M2 y ejercen funciones inmunosupresoras dentro del ambiente tumoral (Puig-Kröger *et al.*, 2009). En los últimos años, se ha detectado la presencia de estos macrófagos en enfermedades inflamatorias crónicas como en la osteoartritis (Tsuneyoshi *et al.*, 2012).



**Figura 11.** Esquema de la polarización de la microglía. Gluc: glucocorticoides; ApC: células apoptóticas; IC: inmunocomplejos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, IL1Ra: receptor antagonista de IL1 (Adaptado de Arango y Descoteaux, 2014)

Los macrófagos y la microglía son un tipo celular plástico, que se adaptan a los cambios de citoquinas en el medio (Davis *et al.*, 2013). Frente a estímulos de daño agudos se promueve la producción de citoquinas IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  que producen la activación clásica de la Microglía (M1), por lo que algunos autores sugieren que alterar el medio de citoquinas podría ser una herramienta para el tratamiento de lesiones. Por ejemplo, en cultivos celulares y en animales con lesión en la médula espinal se indujo

la activación microglial alternativa (M2), y se observó que el cambio en los niveles de citoquinas (aumento de IL4/13 y descenso de TNF $\alpha$ ) se asociaba con un aumento en los niveles de Arg1 y una disminución de los parámetros inflamatorios, conduciendo a una recuperación locomotora y a una reducción de la cicatriz (*Nakajima et al., 2012*). También se ha visto que estimulando la vía del PPAR $\gamma$ , mediante el uso de agonistas, se puede inducir el fenotipo M2 en la microglía, para el tratamiento de lesiones traumáticas en cerebro (*Yi et al., 2008*) e isquemia cerebral (*Lee et al., 2011*).

Una molécula que podría jugar un papel importante en la polarización de la microglía es la fractalquina (CX3CL1). Si bien su función principal es la atracción de linfocitos y monocitos por quimiotaxis, se ha observado que jugaría un papel regulador en la neurotoxicidad microglial (M1) *in vivo*, lo que induciría el fenotipo M2 promoviendo neuroprotección y supervivencia neuronal en ratones con esclerosis lateral amiotrófica y en modelos animales de Parkinson (*Cardona et al., 2006*). En cambio, en modelos de isquemia cerebral focal, o de isquemia/reperfusión en ratones deficientes del receptor de fractalquina (CX3CR1) son menos susceptibles al daño (*Fumagalli et al., 2013*).

Otro sistema que podría jugar un rol importante en la polarización de la microglía es el sistema endocannabinoide. Los agonistas de CB1 promueven una respuesta proinflamatoria en macrófagos a través de la producción de ROS, lo cual regula negativamente a CB2 (*Han et al., 2009*), por lo que CB1 contribuye al mantenimiento de la polarización M1. Además, se ha observado que  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC, un agonista de los receptores CB1 y CB2) aumenta la expresión del factor de transcripción GATA3 (*GATA binding protein 3*) que promueve la secreción de IL4, pero no se observan efectos en ratones deficientes de CB2 expuestos a *Legionella* (*Klein et al., 2000; Newton et al., 2009*), lo que sugiere que CB2 tendría un rol fundamental en el cambio de polarización desde M1 a M2 en presencia de una infección bacteriana.



### 3 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema endocannabinoide (ECS) es un sistema homeostático que puede activarse en respuesta a diversos estímulos, tanto a nivel periférico como en el SNC.

Dicho sistema posee de dos receptores principales (CB1 y CB2) y otros accesorios, ligandos endógenos (endocannabinoides, eCB), las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de los mismos y mecanismos específicos de recaptación.

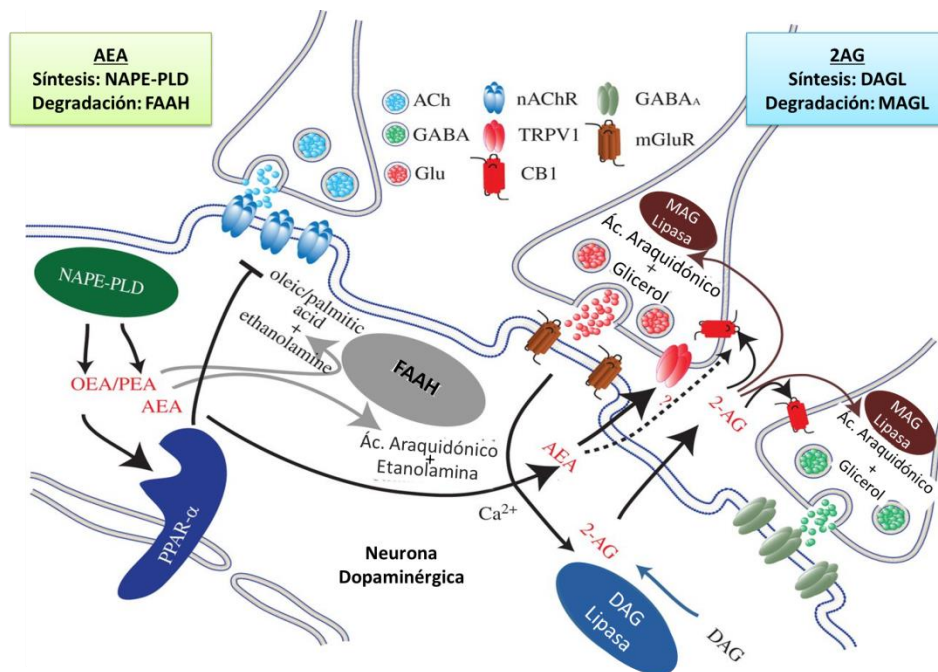
Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G, principalmente Gi/o. Ambos fueron caracterizados a principios de los 90' (*Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993*). CB1 se localiza principalmente en el SNC, pero también se ha identificado en otros tejidos (*rev. en Mackie, 2005*). Su expresión es mayoritariamente presináptica, en axones y terminales nerviosos, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores, aunque también pueden estar presentes en las dendritas y soma neuronal (*rev. en Howlett, 2002*). Por su parte, CB2 se expresa principalmente en las células periféricas del sistema inmune (*Gong et al., 2006*), y en menor concentración en músculo, hígado, intestino, testículo, tejido adiposo y algunas áreas cerebrales (*Roche et al., 2006; Liu et al., 2009; García-Gutiérrez et al., 2010*). Las concentraciones de CB2 en cerebros sanos es baja, sin embargo estas aumentan cuando existe un proceso inflamatorio (*Ashton et al., 2007*). Otros receptores se relacionan con el ECS, como el receptor PPAR $\alpha$ , el cual interactúa con los subtipos de endocannabinoides N-palmitoiletanolamina (PEA) y N-oleoiletanolamina (OEA) (*Sun et al., 2007*); el receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1), y el receptor huérfano GPR55 (*Ryberg et al., 2007; Marco et al., 2014*).

Los eCB pertenecen a la familia de ácidos grasos poliinsaturados, y son sintetizados y liberados “a demanda” (*rev. en Piomelli, 2003*) a partir del ácido araquidónico. Los principales eCB son la N-Araquidonoil-etanolamida (AEA, anandamida) y 2-Araquidonil glicerol (2AG) (*Devane et al., 1992*). AEA es producida por células del sistema inmune y neuronas, además tiene mayor afinidad por los

receptores CB1; mientras que 2AG es agonista completo para ambos receptores CB1 y CB2 (Sugiura *et al.*, 2002) (Fig.12).

AEA posee diversas rutas de síntesis, pero la principal es una reacción de dos pasos catalizada por la enzima N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD), mientras que su degradación se orchestra principalmente por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (McKinney y Cravatt, 2005; Tsuboi *et al.*, 2013). Por otro lado, la síntesis de 2AG esta catalizada por la diacilglicerol lipasa (DAGL), mientras que varias enzimas son capaces de hidrolizar 2AG, siendo la principal la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Blankman *et al.*, 2007; Reisenberg *et al.*, 2012) (Fig.12).

El ECS juega un rol crucial en la modulación de la neurogénesis, la neurotransmisión y como sistema neuroprotector. Además, regula un gran número de funciones fisiológicas como ansiedad, aprendizaje, memoria, metabolismo, reproducción y regulación hormonal entre otras (rev. en Mechoulam y Shohami, 2007).



**Figura 12.** Esquema del sistema endocannabinoide. ACh: Acetilcolina; Glu: Glutamato; nAChR: Receptor nicotínico de Acetilcolina; TRPV1: Receptor vanilloide 1; mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato. (Adaptado de Melis y Pistis, 2012)

En los últimos años, la modulación del sistema endocannabinoide ha surgido como una interesante diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades del SNC

(Kucerova et al., 2014). En particular, diversos estudios relacionan las alteraciones del ECS con algunas enfermedades psiquiátricas. Por mencionar algunos ejemplos, se ha observado que los niveles de eCB en líquido cefalorraquídeo (LCR) correlacionan negativamente con la gravedad de la sintomatología en esquizofrenia (Giuffrida et al., 2004); se ha detectado un aumento de la expresión génica del receptor CB1, así como de su funcionalidad, en la corteza prefrontal *postmortem* de individuos suicidas diagnosticados de depresión (Hungud et al., 2004). Por otro lado, se ha observado en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con un primer episodio psicótico (PEP) un desequilibrio entre las enzimas de síntesis de eCB y las enzimas de degradación de eCB, que se encuentran disminuidas y aumentadas respectivamente (Bioque et al., 2013).

## 4 ESQUIZOFRENIA

### 4.1. GENERALIDADES

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica crónica, compleja, incurable y heterogénea que afecta al 1% de la población mundial, bajo la cual se agrupa un conjunto de trastornos mentales con anormalidades en la conectividad y plasticidad sináptica que se caracterizan por presentar alteraciones en la percepción de la realidad, en el pensamiento, las emociones y la conducta (rev. en Insel, 2010; Pocklington et al., 2014). Estudios epidemiológicos han puesto en evidencia el gran impacto social, laboral y económico (Gustavsson et al., 2011). Las personas que la padecen tienen un mayor riesgo de mortalidad, debido a conductas suicidas que a veces se asocian a la patología, se estima que la esperanza de vida es 10-12 años menor que en la población general. Además es una importante causa de pérdida de años de vida por discapacidad (75% de las personas que la sufren no trabajan) (Collins et al., 2011; Murray et al., 2012). Se predice que para el 2030, estará entre las principales causas de discapacidad a nivel mundial (Mathers y Loncar, 2006).

La esquizofrenia se suele diagnosticar en la adolescencia o en la etapa de adulto-joven, tras el debut de un primer episodio psicótico (PEP). Se estima que alrededor del 3% de la población general sufrirá un primer episodio psicótico durante su vida (*Perala et al., 2007*). La remisión completa sólo ocurre en un tercio de los PEP, y cerca del 80% de los pacientes sufrirán un segundo episodio en los siguientes cinco años (*Huber et al., 2008; Alvarez-Jiménez et al., 2009*). Alrededor de un tercio de estos pacientes padecerán esquizofrenia.

Se desconoce la etiología de la esquizofrenia, pero en ella confluyen una serie de factores ambientales y genéticos que marcan la susceptibilidad del individuo al desarrollo de la patología y a la progresión de la misma (*Straub y Weinberger, 2006; van Dongen et al., 2013*). Una fase altamente sensible de exposición a estos factores de riesgo de orden ambiental es el periodo prenatal, en donde se ha observado que lesiones cerebrales tempranas, infecciones virales y la desnutrición materna incrementan el riesgo de desarrollar esquizofrenia u otros trastornos psicóticos en la etapa adulto-joven (*Mednick et al., 1988; rev. en Penner y Brown, 2007*). Complicaciones en el parto, como la hipoxia fetal, también influyen en el aumento del riesgo (*Byrne et al., 2007*), al igual que el abuso de drogas (*Pelayo-Terán et al., 2012*), los traumas psicosociales en general (*rev. en Morgan y Fisher, 2007*) y el estrés en particular (*Stahl et al., 2010*).

Dicha enfermedad posee un amplio rango de síntomas que engloba: sintomatología positiva (delirios, alucinaciones), sintomatología negativa (anhedonia, reclusión social), alteraciones cognitivas (trastornos en la memoria ejecutiva y la memoria de trabajo) y alteraciones afectivas (ansiedad, depresión e ideación suicida). Un gran problema de esta patología es que no existen tratamientos específicos, sino que se usan medicamentos para el tratamiento de las psicosis. Los síntomas negativos y los cognitivos son los más persistentes y no mejoran satisfactoriamente con los antipsicóticos existentes (*Tandon et al., 2009; rev. en Kahn, 2015*). Se estima que el 74% de los pacientes abandonan el tratamiento farmacológico en un año y medio, y que 8 de cada 10 pacientes presentarán una recaída entre los 6 meses y los 2 años tras abandonar la medicación antipsicótica (*Kahn et al., 2008*), por lo que se hacen necesarias nuevas dianas terapéuticas y una mejor comprensión de la fisiopatología de

la enfermedad (*rev. en Lewis y Gonzalez-Burgos, 2006*). Los trabajos llevados a cabo por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, han contribuido al aumento del conocimiento sobre aspectos no conocidos de la fisiopatología de la esquizofrenia cuando se hizo esta afirmación.

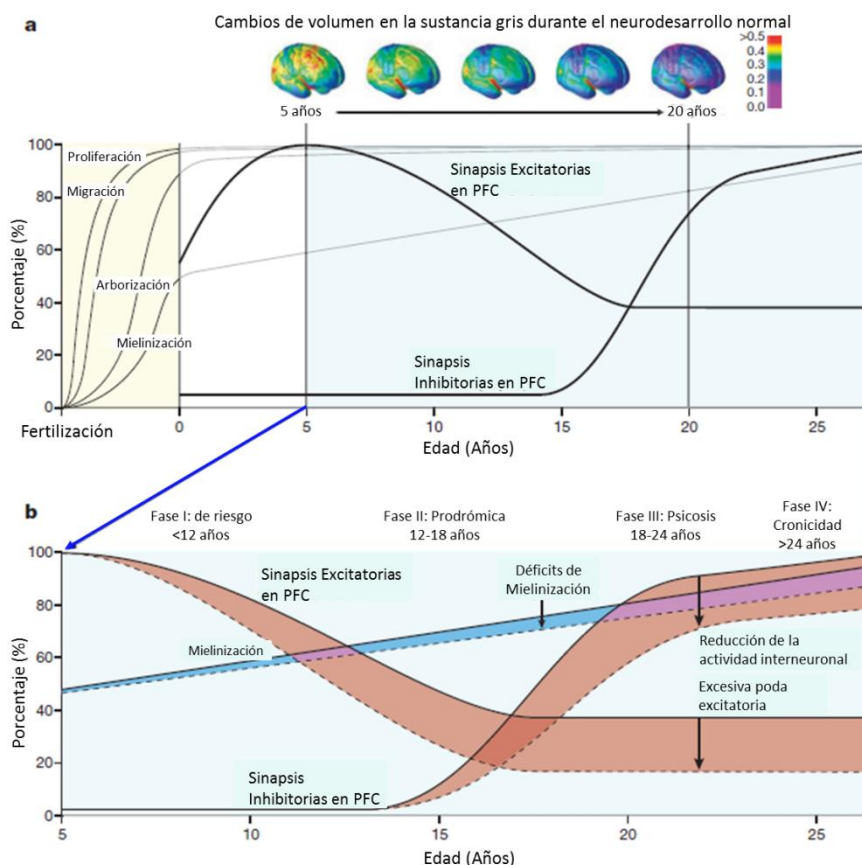
#### 4.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ESQUIZOFRENIA.

Si bien la fisiopatología de la enfermedad aún es desconocida, existen varias hipótesis al respecto, entre las más importantes:

- **Hipótesis de los Neurotransmisores:** En esta categoría se engloban las alteraciones encontradas en los neurotransmisores dopamina, serotonina y glutamato. La “*Hipótesis Dopaminérgica*” postula que la sintomatología positiva se debe a una hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica y una disminución en los niveles de dopamina en la vía mesocortical, responsable de los síntomas negativos. La “*Hipótesis Serotoninérgica*” enfatiza que alteraciones en los niveles de serotonina durante el desarrollo del SNC, la activación de la corteza prefrontal mediante el receptor 5HT<sub>2A</sub> alterado, o una interacción aberrante entre dopamina y serotonina, tienen un rol importante en la fisiopatología de la enfermedad. Por último, se ha observado una disminución en los niveles y actividad de los receptores de glutamato NMDA en pacientes con esquizofrenia, además, el uso de antagonistas de NMDA en personas sanas inducen la sintomatología positiva, negativa y cognitiva de la enfermedad, lo cual dio origen a la “*Hipótesis Glutamatérgica*” (*Pickar et al., 1990; Pocklington et al., 2014*).

- **Hipótesis de la Neurodegeneración:** Los estudios de neuroimagen han arrojado gran cantidad de evidencia relacionada con las diferencias de tamaño y estructurales en áreas cerebrales en pacientes con esquizofrenia, principalmente se ha observado una disminución en el volumen de materia gris en las regiones temporales, frontales y límbicas, especialmente en estructuras como el hipocampo y la amígdala (*Honea et al., 2005; rev. en Shepherd et al., 2012*), y por otro lado, un aumento del volumen ventricular en pacientes con un PEP (*Steen et al., 2006*).

- **Hipótesis del Neurodesarrollo:** Hace dos décadas se sugirió que las alteraciones durante el neurodesarrollo contribuyen a la etiopatogenia de la esquizofrenia (complicaciones pre-, peri- y post-natales), lo cual conllevará a un desarrollo anómalo de los circuitos neuronales, haciendo al individuo susceptible a una poda neuronal excesiva, y a una pérdida de la plasticidad neuronal (*Keshavan et al., 1994; Fatemi y Folsom, 2009*). El efecto combinado de la poda neuronal y la deposición de mielina contribuyen a una progresiva reducción del volumen de sustancia gris observada en estudios longitudinales de neuroimagen en la corteza prefrontal (*Paus et al., 2008*). Se ha demostrado mediante el estudio de cerebros postmortem que dichos procesos ocurren hasta la adultez temprana en la corteza prefrontal (*Huttenlocher, 1984*). La última fase de maduración del cerebro implica una calibración meticulosa del balance excitatorio/inhibitorio en la corteza prefrontal (Fig.13) (*rev. en Insel, 2010*).



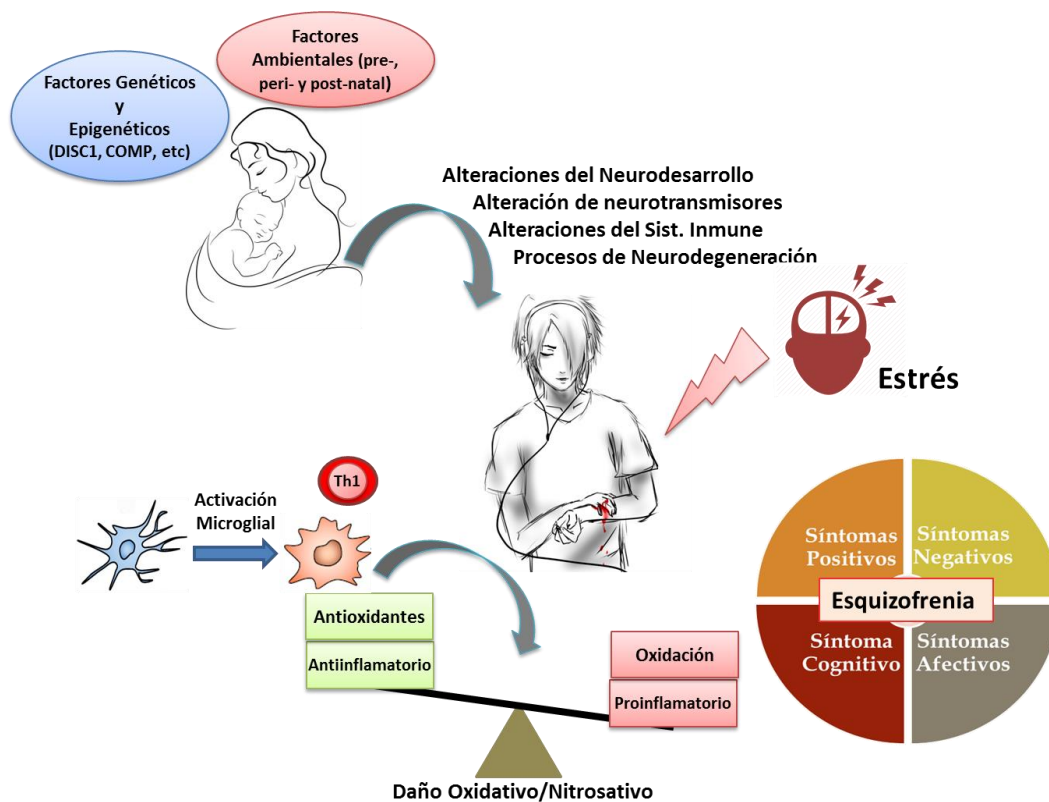
**Figura 13.** Modelo de Neurodesarrollo de la Esquizofrenia. (a) El neurodesarrollo cortical normal implica los procesos de proliferación, migración, arborización y mielinización desde el desarrollo fetal a la juventud. El descenso de las sinapsis excitatorias y el aumento de las inhibitorias coinciden con la fase prodrómica y de sintomatología psicótica de la enfermedad. (b) Alteraciones observadas en niños que desarrollan esquizofrenia. (*Adaptado de Insel, 2010*).

- **Hipótesis de la Inmune/Inflamatoria:** En los últimos años se ha propuesto que el sistema inmune tiene un rol importante en la patogenia de la enfermedad. Estudios recientes demostraron un aumento en los niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias en el SNC de pacientes con esquizofrenia, consecuencia del aumento en la activación microglial, la cual podía ser inhibida mediante el tratamiento con antipsicóticos, que a su vez, algunos tienen efecto anticitoquina (*Sugino et al., 2009*). Una activación microglial descontrolada inhibe la neurogénesis y es capaz de inducir un proceso neurodegenerativo (*Monji et al., 2009, 2013*). Además, se ha observado en pacientes con esquizofrenia alteraciones en la vía del TLR4 a nivel periférico (*McKernan et al., 2011*). Por último, estudios recientes de nuestro laboratorio y de otros, han demostrado que el proceso inflamatorio juega un papel fundamental en el progreso de la enfermedad. La presencia de un desequilibrio entre las vías proinflamatorias y antiinflamatorias, asociadas a las consecuencias oxido/nitrosativas propias del mecanismo, correlacionan con la progresión y gravedad de la esquizofrenia (*García-Bueno et al., 2014a, 2014b*).

Todas estas hipótesis no son excluyentes. De hecho convergen e interactúan, lo cual refleja la complejidad de la esquizofrenia, y seguramente son las causantes del amplio abanico de trastornos y sintomatologías que se engloban en la enfermedad. Varios autores han tratado de combinar las diversas hipótesis en un modelo integrador, en donde los factores ambientales junto con susceptibilidad genética, conllevarían a alteraciones del neurodesarrollo, incluyendo alteraciones en los niveles de neurotransmisores, en la plasticidad y conectividad neuronal, en la activación del sistema inmune, al igual que procesos neurodegenerativos. Lo cual frente a un evento estresante vital y el desequilibrio inflamatorio propiciarían el desarrollo de la enfermedad en la adolescencia o juventud (*Haller et al 2014; Pocklington et al., 2014; Leza et al., 2015*) (Fig.14).

En los últimos años, se ha hecho hincapié en el estudio de nuevos biomarcadores que sean característicos de la enfermedad, de su progresión, indicadores del riesgo a desarrollarla o que puedan servir como nuevas dianas terapéuticas. Dichos esfuerzos se han focalizado en el campo de la genética (*Notaras et al., 2015*), la neuroimagen (*Dusi et al., 2012; Koutsouleris et al., 2015*), la electroencefalografía (*Mitra et al.,*

2015), el metabolismo oxidativo (Do et al., 2009; Ballesteros et al., 2013) y la inflamación (García-Bueno et al., 2014a, b; Hayes et al., 2014)



**Figura 14.** Modelo integrativo de la fisiopatología de la Esquizofrenia.

#### 4.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ESQUIZOFRENIA.

La esquizofrenia se ha tratado desde la década de los 50 con fármacos antipsicóticos desde que se descubrió la clorpromazina (Laborit, 1947). Los mecanismos de acción de estos fármacos no están del todo dilucidados, pero en el caso de los antipsicóticos típicos o clásicos (Tabla 1), actúan bloqueando los receptores de dopamina  $D_2$  (Creese et al., 1975). Son eficaces en el tratamiento de los síntomas positivos de la enfermedad y en la prevención de recaídas. Sin embargo, se estima que entre el 25 y el 60% de los pacientes son refractarios al tratamiento. Además, mejoran pobremente los síntomas negativos, y dentro de las limitaciones observadas tiene gran relevancia la aparición de reacciones extrapiramidales.

El descubrimiento de la clozapina marcó un nuevo hito, dando paso a una nueva generación de antipsicóticos, los conocidos como atípicos o de segunda



generación (Tabla 1). Tienen la capacidad de bloquear una mayor cantidad de receptores (dopaminérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos, histaminérgicos y adrenérgicos) según cada antipsicótico, por lo que tiene un efecto terapéutico sobre los síntomas positivos, algunos síntomas negativos y en ocasiones algunos síntomas cognitivos. Los efectos motores extrapiramidales se reducen con este tipo de antipsicóticos, pero pueden producir un aumento del peso corporal, aumento de la secreción de prolactina y sedación (*rev. en Kapur y Remington, 2001*).

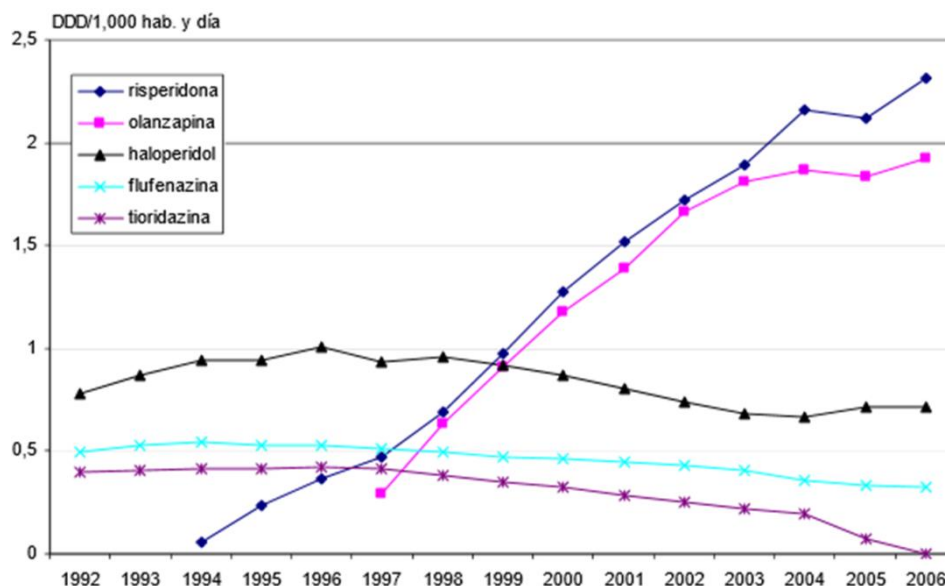
<b>Principales Fármacos Antipsicóticos</b>	
<b>Antipsicóticos Típicos</b>	
<b>Fenotiazinas</b>	Derivados alifáticos: <i>Clorpromazina, trifluopromazina y levomepromazina</i> . Derivados piperidínicos: <i>Tioridazina, metopimazina, pipotiazina y periciazina</i> . Derivados piperazínicos: <i>Flufenazina, perfenazina, trifluoroperazina y tioproperazina</i> .
<b>Tioxantenos</b>	Clorprotixeno (análogo de la clorpromazina). Tiotixeno (análogo de la tioproperazina). Zuclopentixol (análogo de la perfenazina).
<b>Butirofenonas</b>	Haloperidol y droperidol.
<b>Difenilbutilpiperidinas</b>	Pimozida.
<b>Análogos de las fenotiazinas</b>	Dibenzoxazepina: loxapina. Dibenzotiepina: clotiapina.
<b>Antipsicóticos Atípicos</b>	
<b>Benzamidas</b>	Sulpirida, tiaprida, cacloprida y amisulpirida.
<b>Derivados de indol</b>	Sertindol y ziprasidona.
<b>Diazepinas, oxazepinas, tiazepinas y oxepinas</b>	Clozapina, olanzapina, quetiapina, metiapina, asenapina y clotiapina.
<b>Otros</b>	Aripiprazol, risperidona, paliperidona.

**Tabla 1.** Clasificación de los principales antipsicóticos.

Especial preocupación genera el desarrollo del síndrome metabólico durante la esquizofrenia (*Na et al., 2012*), engloba una serie de alteraciones como: obesidad, hipertensión, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL. Tiene una prevalencia del 15.1 al 23.7% en la población general, la cual aumenta del 22.2 al 60% en las personas con esquizofrenia (*Kang et al., 2011*). Se ha sugerido que los antipsicóticos atípicos contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico (*Padmavati et al., 2010*), pero la inflamación también juega un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad (*rev. en Reilly y Rader, 2003; Leonard et al., 2012*).

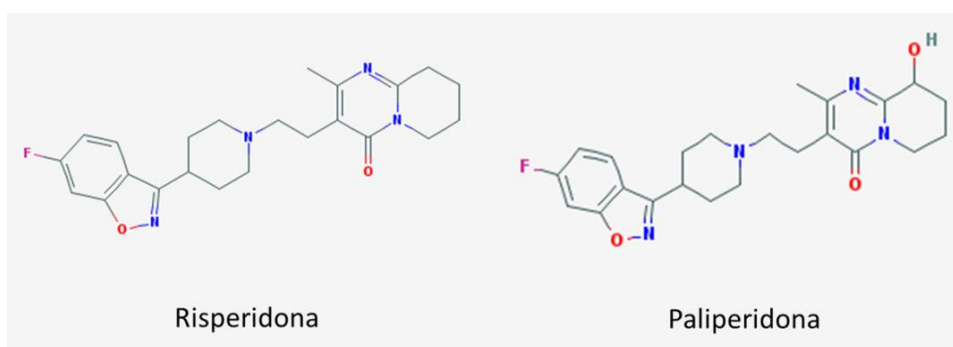
El último informe de la agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) acerca del consumo de antipsicóticos entre los años 1992 y 2006

señala que entre los antipsicóticos más utilizados se encuentran la risperidona y la olanzapina, ambos de segunda generación (Fig.15).



**Figura 15.** Utilización de los principales antipsicóticos en España. Datos expresados en DDD/1.000 hab. y día. DDD: dosis diaria definida. Sistema Nacional de Salud.

Durante el curso de esta Tesis Doctoral, se utilizaron dos antipsicóticos atípicos, Risperidona (RSP; (3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)- 1-piperidinil]etil]-6,7,8,9-tetrahidro-2-metil-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona)) y su metabolito activo, Paliperidona (PAL; 9-Hidroxisisperidona) (Fig.16).



**Figura 16.** Representación de la estructura química de Risperidona y Paliperidona


Ambos son antagonistas potentes de los receptores de dopamina  $D_2$  y de serotonina  $5HT_{2A}$ , pero también actúan como antagonistas de los receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $H1$ .

En la esquizofrenia, la disfunción dopaminérgica central constituye la base biológica más aceptada de su etiología. Se ha propuesto que la sintomatología negativa se debería a la hipoactividad dopaminérgica de la vía mesocortical, mientras que la positiva (halucinaciones, delirios, etc) serían síntomas secundarios relacionados con la hiperactividad dopaminérgica mesolímbica, consecuencia de la desregulación del mecanismo compensatorio del circuito mesocorticoprefrontal dorsolateral, por lo que el bloqueo de los receptores D<sub>2</sub> conlleva el principal efecto terapéutico. Dado que las neuronas serotoninérgicas tienen su origen en los núcleos del rafe, donde inervan las neuronas dopaminérgicas del cuerpo estriado y de la sustancia negra, se produce un efecto inhibitor adicional (la serotonina inhibe la liberación de dopamina), el bloqueo de los receptores 5HT<sub>2A</sub> contribuyen a la eficacia sobre algunos de los síntomas negativos mediante la disminución de la inhibición en la vía mesocortical, que a su vez impide el incremento de prolactina consecuencia del bloqueo dopaminérgico, disminuyendo la incidencia de galactorrea, amenorrea y ginecomastia. Por otro lado, el bloqueo dopaminérgico en la vía nigroestriatal produce los efectos extrapiramidales, pero con estos antipsicóticos se compensa mediante el incremento de la liberación de dopamina gracias al bloqueo de los receptores 5HT<sub>2A</sub>.

Son antipsicóticos de rápida absorción y distribución, alcanzando su pico de concentración plasmática máxima 1h tras la ingesta oral para RSP, y a 3 horas para PALI. El 90% de RSP se encuentra unido a proteínas plasmáticas, mientras que PALI se une en un 77% (*Regenthal et al., 2005; Jones et al., 2010*). La RSP se metaboliza en el hígado por el citocromo P-450 CYP2D6, y en menor grado por CYP3A4, al metabolito activo PALI, el cual sufre una metabolización mínima en el hígado, dándose mayoritariamente en el riñón.

A pesar de la mejora en el tratamiento de los síntomas positivos, los antipsicóticos aún son ineficaces frente a la sintomatología negativa y cognitiva (*Stahl y Buckley, 2007*). Es por ello que hoy en día se hace necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas o de herramientas adyuvantes en el tratamiento de la esquizofrenia.





### III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

### 1.1. ANTECEDENTES.

La esquizofrenia es una enfermedad crónica, incurable y de gran impacto socioeconómico que afecta al 1% de la población mundial, cuyos tratamientos disponibles sólo mejoran la sintomatología positiva de la enfermedad, y algunos de los síntomas negativos, pero no mejoran ni los cognitivos ni los afectivos. Además, tienen importantes efectos adversos, una baja adherencia y un porcentaje importante de los pacientes no responden a los ellos (*rev. en Lally y MacCabe, 2015*). La etiopatología de la esquizofrenia aún es desconocida, pero existen varias hipótesis que intentan explicarla.

La teoría más extendida, se basa en la existencia de alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica que están fuertemente relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad. Otras teorías también han implicado a otros neurotransmisores, como la serotonina y el glutamato, pero ninguna de ellas explica en su totalidad la complejidad de la patología psicótica. Actualmente, existen otras hipótesis que tratan de dilucidar los posibles mecanismos relacionados desde el punto de vista de la neurodegeneración, el neurodesarrollo, la disfunción inmune y la neuroinflamación.

- **Esquizofrenia e Inflamación:** En las últimas décadas, se ha considerado que la respuesta inflamatoria (ya sea por factores endógenos o exógenos) tiene un papel importante en la etiología y fisiopatología de la enfermedad. Gran cantidad de evidencias apoyan la hipótesis inflamatoria:

1.- Aumento de citoquinas proinflamatorias tanto en el cerebro como a nivel periférico en pacientes con esquizofrenia (*Müller y Schwarz, 2008*).

2.- Incremento de los niveles de mRNA de genes relacionados con la inflamación (*Drexhage et al., 2010*).

3.- Niveles elevados de la prostaglandina proinflamatoria E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (*Kaiya et al., 1989*), al igual que una elevada actividad de su enzima productora COX-2 (*Yokota et al., 2004*).

4.- La esquizofrenia también se ha asociado con un aumento sistémico de los niveles de mediadores oxidativos, como el malondialdehído (producto tóxico de la destrucción de las membranas celulares) (*Emiliani et al., 2014; García-Bueno et al., 2014a*).

5.- Desde el punto de vista farmacológico se ha determinado que tratamientos con inhibidores de COX-2 como terapia coadyuvante mejoran algunos de los síntomas cognitivos presentados (*Akhondzadeh et al., 2007*); de igual manera, compuestos con propiedades antioxidantes o antiinflamatorias mejoran algunos de los síntomas de la enfermedad, pero su efecto no es mantenido (*Berk et al., 2008*).

6.- Por último, se ha observado que algunos antipsicóticos como haloperidol, clozapina y risperidona poseen efectos anticitoquinas proinflamatorias (*Sugino et al., 2009*).

Uno de los estímulos que desencadena la respuesta inflamatoria y que constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, es la exposición a experiencias estresantes, ya sean psicológicas o físicas (*Stahl, 2010*). Durante las primeras fases de la respuesta a estrés, el sistema nervioso simpático libera catecolaminas, que actúan como agentes potenciadores del sistema inmune y del proceso neuroinflamatorio, al estimular la producción de mediadores proinflamatorios como las citoquinas TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6. Dichas citoquinas son capaces de activar la vía del NF $\kappa$ B mediante la inducción de la degradación de su subunidad inhibitoria I $\kappa$ B; una vez libre NF $\kappa$ B, trasloca al núcleo reconociendo secuencias específicas del DNA, promoviendo la síntesis de citoquinas y enzimas proinflamatorias como iNOS y COX-2, entre otras. La acción de estas enzimas genera una acumulación de mediadores proinflamatorios (citoquinas y prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub>, entre otros) y radicales libres, los cuales en altas concentraciones inducen el daño celular, por ejemplo la ruptura de las membranas celulares mediante la peroxidación lipídica. Por otro lado, la hiperactividad de COX-2 pone en marcha un mecanismo compensatorio que lleva a la síntesis de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub>, que por sí misma o mediante la unión a su receptor PPAR $\gamma$  inhiben la activación de la vía del NF $\kappa$ B.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio en paralelo a los trabajos que se presentan aquí, han constatado que tanto en esquizofrenia crónica como en PEP existe

un desequilibrio entre los parámetros pro/anti inflamatorios en el desarrollo y progresión de la enfermedad (*Martínez-Gras et al., 2011; García-Bueno et al., 2014a*).

Por otro lado, resultados recientes de nuestro laboratorio en proceso de publicación, sugieren que esta vía inflamatoria también se activa mediante la estimulación de receptores de inmunidad innata como los TLRs.

- **Esquizofrenia y Sistema Inmune:** La respuesta inmune innata es inespecífica y protectora, pero cuando es excesiva en intensidad o duración, se vuelve nociva. Uno de los principales elementos de la inmunidad innata, es la familia de los receptores TLRs, los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño celular (DAMPs) circulando en el medio. Dentro de los más representativos encontramos el TLR4, que reconoce principalmente el LPS, un componente estructural de las bacterias Gram-, y el TLR3, que reconoce el DNA doble hebra de virus. Ambos se encuentran altamente expresados en las células del sistema inmune, pero también en poblaciones celulares del SNC: astrocitos, microglías (macrófago residente), células epiteliales y neuronas (en el caso del TLR4), entre otras. La activación de estos receptores desencadena una respuesta inflamatoria mediante la activación de la vía del NFκB o del IRF3 principalmente.

Alteraciones en este sistema han sido directamente implicadas en la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas (*rev. en Kirkpatrick y Miller, 2013*).

1.- Se ha observado un aumento en la activación y densidad microglial en tejido cerebral post-mortem de pacientes esquizofrénicos (*Steiner et al., 2008*).

2.- Se ha descrito que en pacientes esquizofrénicos existen alteraciones en las vías de los TLRs a nivel periférico (*McKernan et al., 2011*).

3.- En modelos animales de estrés crónico, se ha sugerido que la activación de TLR4 regula la neuroinflamación inducida por la traslocación bacteriana intestinal debido al aumento en la permeabilidad intestinal inducida por el estrés (*Gárate et al., 2011; 2013*).

4.- Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que infecciones prenatales víricas, (que inducen una activación inmune temprana mediante el TLR3) inducen un aumento en el riesgo de sufrir esquizofrenia (*Watson et al., 1984; Limosin et al., 2003; Brown et al., 2005*).



5.- En modelos animales de infección prenatal se han observado una serie de cambios semejantes a los que suceden en pacientes con esquizofrenia, como:

- La activación del TLR3 inhibe la neurogénesis cortical y causa alteraciones comportamentales (*De Miranda et al., 2010*).
- Se producen alteraciones estructurales en hipocampo, estriado, corteza prefrontal y ventrículos laterales (*Piontkewitz et al., 2012*).
- Se ocasionan cambios en el sistema de neurotransmisión capaces de disminuir la inhibición prepulso (ppi, es una técnica de comportamiento que hace referencia al grado con el cual un estímulo sensorial débil (prepulso) es capaz de inhibir la respuesta motora refleja frente a un estímulo intenso (pulso), midiendo la capacidad de adaptación del sistema nervioso) (*Forrest et al., 2012; Deslauriers et al., 2013*).

6.- Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento con risperidona es capaz de inhibir la activación microglial inducida por IFN $\gamma$  (*Kato et al., 2007*).

7.- En el modelo animal de infección prenatal, se ha observado que la administración crónica de RSP y PALI normalizan los niveles extracelulares de glutamato (*Roemaker et al., 2011*). Además, la administración de RSP durante la pre-adolescencia previene alteraciones comportamentales y alteraciones cerebrales estructurales (como el aumento de los ventrículos y la disminución del hipocampo) (*Piontkewitz et al., 2011*).

Recientemente se ha sugerido que la activación microglial está estrechamente relacionada a la fisiopatología de la enfermedad (*Jhamnani et al., 2013*). La plasticidad de estas células se puede simplificar en dos tipos principales, los M1, microglías proinflamatorias con capacidad fagocítica y que pueden dañar el tejido; y los M2, que son considerados inmunomoduladores, responsables de la remodelación tisular y la reparación. Se ha observado que en personas que sufren enfermedades psiquiátricas crónicas como la bipolaridad el perfil M1 se encuentra aumentado frente al M2 (*Brambilla et al., 2014*).

- **Esquizofrenia y Sistema Antioxidante:** El proceso inflamatorio y la activación microglial conllevan una alta producción de radicales libres, que al acumularse pueden inducir graves daños celulares, es por ello es necesario contar con un mecanismo antioxidante regulador.

Uno de los mecanismos antioxidantes más importantes es el regulado por el factor de transcripción NRF2. Dicho factor se encuentra unido a una proteína inhibidora (Keap1) en reposo, pero ante señales de daño oxidativo se induce un cambio conformacional en Keap1, dejando libre a NRF2, permitiéndole traslocar al núcleo, donde se une a secuencias específicas de DNA llamadas “Elementos de Respuesta Antioxidante” (ARE), dando lugar a la transcripción de diversos genes que dan lugar a las enzimas antioxidantes de fase II (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, hemo oxigenasa 1, entre otras) y proteínas que participan en procesos detoxificantes, antiinflamatorios, en el metabolismo del GSH, entre otras funciones.

Existe gran cantidad de evidencia de que el balance entre la producción de radicales libres y el sistema antioxidante está alterado en la esquizofrenia:

1.- Existe gran cantidad de evidencia de alteraciones en los niveles de las principales enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión y glutatión peroxidasa en los pacientes de esquizofrenia (*Padurariu et al., 2010; rev. en Bitanhirwe y Woo, 2011; Martínez-Cengotitabengoa et al., 2012; 2014*)

2.- Se ha observado una disminución en los niveles de glutatión (GSH), estos últimos pueden predecir la pérdida de volumen de áreas cerebrales en niños y adolescentes con un primer episodio psicótico (*Fraguas et al., 2012; Gonzalez-Pinto et al., 2012*).

3.- Por otro lado, el sistema antioxidante orquestado por el factor de transcripción NRF2 puede inducir una polarización M2, mediante la secreción de Hemo Oxigenasa 1 (HO1) que tiene propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (*Weis et al., 2009; Naito et al., 2014*).

4.- Además, agonistas de la vía del NRF2 previenen los déficits cognitivos inducidos por fenciclidina (PCP) en adolescentes (*Shirai et al., 2015*), de igual manera en modelos animales de PCP se ha observado que la activación del NRF2 previene la hiperlocomoción y los déficits de la inhibición prepulso (*Shirai et al., 2012*).

5.- Además, se ha observado que risperidona revierte la disminución de los niveles de glutatión inducidos por PCP en el cerebro de rata (*Stojković et al., 2012*).

6.- Recientemente, se ha observado que el uso de adyudantes antioxidantes como N-acetilcisteína junto con risperidona mejoran la sintomatología negativa en los pacientes con esquizofrenia (*Farokhnia et al., 2013*).

- **Esquizofrenia y Sistema Endocannabinoide:** Otro posible mecanismo inmunoregulator de estos antipsicóticos se basan en la activación del sistema endocannabinoide (ECS).

El ECS se ha postulado como un sistema homeostático que puede ser activado mediante múltiples estímulos, su finalidad es restaurar el balance tanto a nivel del sistema nervioso central como a nivel periférico (*Maccarrone et al., 2001*); está implicado en la modulación de la neurogénesis, neurotransmisión, y neuroprotección. Además afecta diversas funciones biológicas como la ansiedad, la ingesta de alimentos, el aprendizaje y la memoria, el metabolismo, la reproducción y la regulación hormonal entre otros (*rev. en Skaper y Di Marzo, 2012*). Diversos estudios han demostrado la implicación de éste sistema en la fisiopatología de la esquizofrenia:

1.- La disminución en la expresión y actividad de los receptores cannabinoides CB1 (*Eggan et al., 2008*); y la delección del receptor cannabinoide CB2 se relaciona con un comportamiento de tipo esquizoide en los modelos animales (*Ortega-Alvaro et al., 2011*).

2.- Se han encontrado elevados niveles de AEA en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia (*Giuffrida et al., 2004; Leweke et al., 1999*).

3.- Recientemente hemos observado a nivel periférico una desregulación en el sistema endocannabinoide en pacientes con primeros episodios psicóticos, específicamente un aumento en la expresión de las enzimas de degradación de los endocannabinoides y una disminución en las enzimas responsables de su síntesis (*Bioque et al., 2013*).

4.- En los últimos años, hemos propuesto un posible rol regulador de los receptores de CB en la excitotoxicidad y neuroinflamación inducidos por estrés en la corteza prefrontal en modelos animales (*Zoppi et al., 2011*).

5.- El aumento de los niveles de AEA, ya sea por inhibición de su principal enzima de degradación (FAAH) o por inhibición de su recaptación, reduce la activación del TLR4 y por ende el aumento de los niveles de citoquinas y mediadores

proinflamatorios, y por otro lado, aumenta la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL10 (Tham *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2010). Similar efecto induce el aumento de los niveles de 2-AG (Lu *et al.*, 2014; Henry *et al.*, 2015).

6.- Se ha observado que 2-AG activa la vía del PPAR $\gamma$  en los macrófagos de polarización M2 (Rockwell *et al.*, 2006).

## 1.2. JUSTIFICACIÓN.

La esquizofrenia afecta al 1% de la población mundial, es una patología crónica y compleja que no tiene cura. Tiene un gran costo social, laboral y económico. La Unión Europea ha estimado que el gasto anual de la patología es de casi 100 billones de euros (Olesen *et al.*, 2012). Además, se estima que para el 2030 será una de las principales causas de invalidez. Por otro lado, los tratamientos farmacológicos existentes poseen importantes efectos secundarios, una baja adherencia y un alto índice de ineficacia.

Como se ha explicado en los apartados anteriores, las alteraciones del sistema inmune juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia.

Por ello se hace importante el estudio de los mecanismos relacionados con el sistema inmune innato y la respuesta inflamatoria que pudieran estar implicados en la etiología y fisiopatología aún desconocida de la enfermedad, al igual que la búsqueda de nuevos biomarcadores y de nuevas dianas terapéuticas o de alternativas adyuvantes que contribuyan al tratamiento.

En esta tesis doctoral se ha realizado un detallado análisis del equilibrio inflamatorio y de la función del sistema inmune en diversos modelos animales de neuroinflamación (inducidos por LPS y estrés), y en uno de los modelos animales de esquizofrenia más utilizados en la actualidad (infección inmune prenatal). De igual manera, se ha realizado un subestudio longitudinal con muestras humanas de pacientes en un PEP, en donde previamente se observó el desequilibrio inflamatorio, con la finalidad de observar la evolución de dichos parámetros según el uso de risperidona o paliperidona en comparación con otros antipsicóticos a lo largo de un periodo de tiempo de un año.

## 2. HIPÓTESIS

Según los antecedentes anteriormente expuestos, se plantea la siguiente hipótesis (Fig.17):

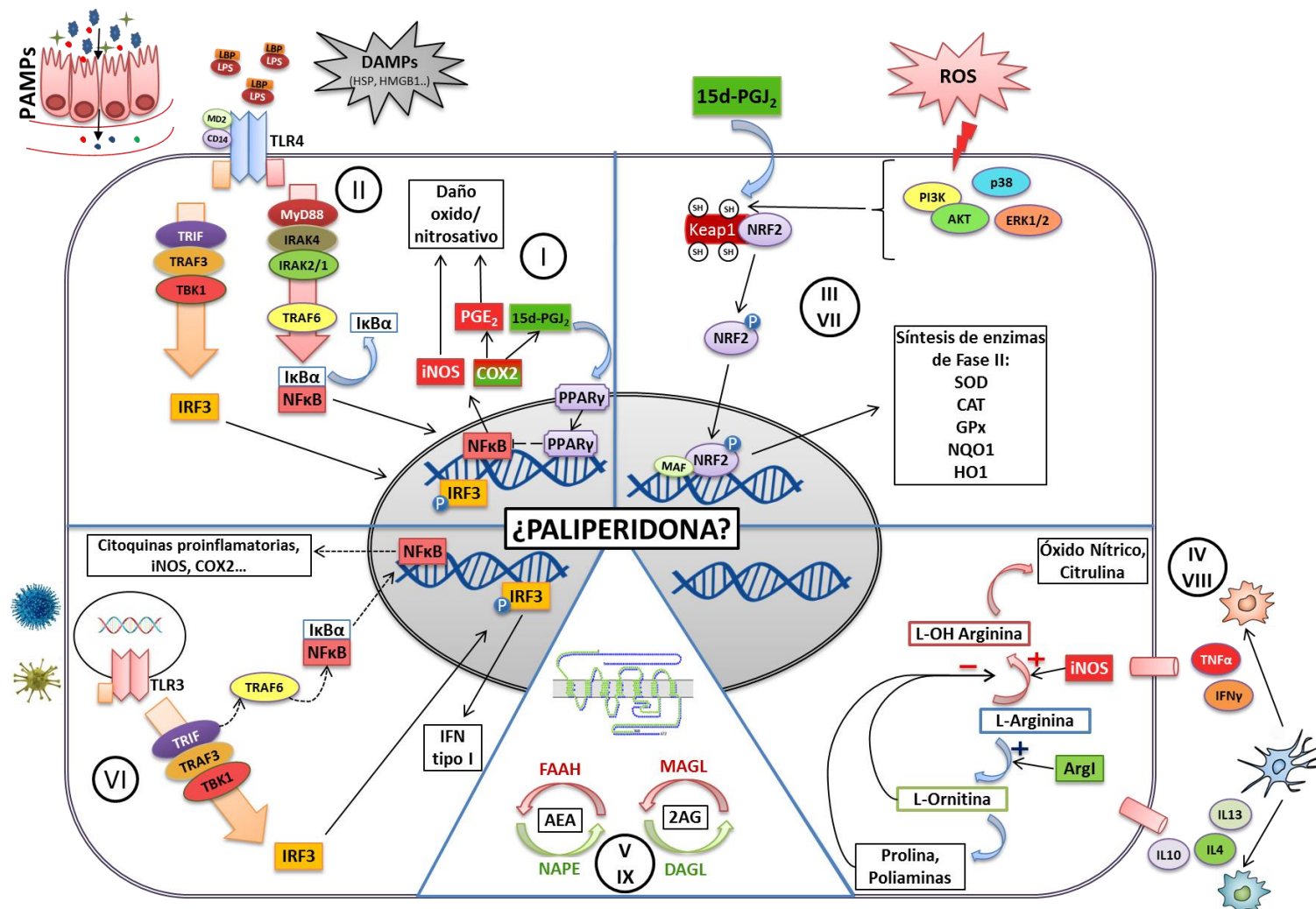
***“Los antipsicóticos risperidona y paliperidona poseen un papel inmunomodulador que previene la activación del sistema inmune y por ende, normalizan el desequilibrio proinflamatorio / antiinflamatorio presente en modelos neuroinflamatorios por exposición a estrés y en un modelo animal de esquizofrenia”.***

## 3. OBJETIVOS.

Para verificar esta hipótesis se propusieron los siguientes objetivos (Fig.17):

- I. Evaluar el efecto antiinflamatorio de risperidona y paliperidona en corteza prefrontal y a nivel sistémico en un modelo animal de neuroinflamación agudo inducido por LPS, tanto a nivel de marcadores solubles como de sus vías pro/anti inflamatorias intra e intercelulares.
- II. Dilucidar el efecto regulador de la paliperidona en la activación de la vía del receptor de inmunidad innata TLR4 y la neuroinflamación consecuente producidas en corteza prefrontal en un modelo animal de estrés por inmovilización agudo y crónico.
- III. Esclarecer el efecto de paliperidona en la activación de nuevas vías alternativas antiinflamatorias/antioxidantes de paliperidona (reguladas por PPAR $\gamma$  y NRF2) en un modelo animal de estrés agudo y crónico.
- IV. Evaluar el efecto de paliperidona en la síntesis de citoquinas y la activación microglial (balance M1/M2) en corteza prefrontal en un modelo animal de estrés agudo y crónico.


- V. Estudiar el efecto de paliperidona en las alteraciones producidas en el sistema endocannabinoide en la corteza prefrontal y a nivel sistémico en un modelo animal de estrés agudo y crónico.
- VI. Dilucidar el efecto regulador de la paliperidona en la activación de la vía del receptor de inmunidad innata TLR3 y la neuroinflamación consecuente producidas en un modelo animal de esquizofrenia inducido por activación inmune prenatal.
- VII. Esclarecer el efecto de paliperidona en la activación de nuevas vías alternativas antiinflamatorias/antioxidantes de paliperidona (reguladas por PPAR $\gamma$  y NRF2) en un modelo animal de esquizofrenia inducido por activación inmune prenatal.
- VIII. Evaluar el efecto de paliperidona en la síntesis de citoquinas y la activación microglial (balance M1/M2) en la corteza prefrontal de un modelo animal de esquizofrenia inducido por activación inmune prenatal.
- IX. Estudiar el efecto de paliperidona en las alteraciones producidas en el sistema endocannabinoide en la corteza prefrontal de un modelo animal de esquizofrenia inducido por activación inmune prenatal.
- X. Evaluar el efecto de paliperidona en el deterioro cognitivo del modelo animal de esquizofrenia inducido por activación inmune prenatal.
- XI. Determinar los posibles efectos de risperidona y paliperidona en la normalización de la vía pro/anti inflamatoria a nivel sistémico en pacientes con un primer episodio psicótico.



**Figura 17.** Representación de la hipótesis y los objetivos (I-IX). Se muestran todos los elementos evaluados en esta Tesis.







## IV. Material & Métodos

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en primer lugar, se emplearon ratas Wistar machos adultos (HsdRccHan:Wist, de Harlan Ibérica), las cuales se sometieron a diversos modelos experimentales de neuroinflamación según el objetivo de estudio. En segundo lugar, se utilizó un modelo animal de activación inmune prenatal mediante infección materna (MIA) en ratón C57BL/6J como modelo animal de esquizofrenia. Por último, también se emplearon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y plasma procedentes de pacientes con un primer episodio psicótico (FEP) y controles sanos.

En esta sección se describen en primer lugar, los diferentes modelos de neuroinflamación a los que se sometieron los animales, y el modelo animal de esquizofrenia que componen los tres primeros bloques de resultados en esta Tesis. Posteriormente, se detallan las características de la colección de muestras procedentes de humanos con un primer episodio psicótico. Finalmente, se explican las técnicas y protocolos empleados para la obtención de resultados y los análisis estadísticos utilizados durante el curso de esta Tesis Doctoral.

Todos los procedimientos experimentales utilizados en esta Tesis se realizaron según la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid y de la Universidad del País Vasco, conforme a la regulación nacional y europea (RD 53/2013; DC 2010/63/UE).

En esta sección se adjunta una copia del diploma de la “Acreditación para la utilización de animales en experimentación: categoría B” de la autora de esta Tesis Doctoral. De igual manera, se presentan los permisos de los comités éticos de cada uno de los hospitales participantes en el proyecto “FLAMMPEPS”.

## 1. MODELOS ANIMALES.

Los animales utilizados fueron estabulados en grupos de 4 individuos por jaula bajo condiciones estándar de temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad (50-55%), con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (encendido a las 8:00 AM) y con libre acceso a comida y agua, en el CAI Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. El proceso de habituación se extendió al menos una semana, y los experimentos fueron realizados en la misma sala.

Para la evaluación de los efectos antiinflamatorios de los antipsicóticos Risperidona y Paliperidona en modelo de neuroinflamación inducidos por LPS y estrés se emplearon ratas macho Wistar Hannover (no consanguíneas) adultos jóvenes, de aproximadamente 12 semanas de edad, con un peso comprendido entre los 250 y 275gr.

Para la evaluación de los efectos antiinflamatorios de Paliperidona en un modelo animal de esquizofrenia basado en la activación inmune prenatal se utilizaron ratonas nulíparas C57BL/6J de más de 8 semanas de edad. Este procedimiento fue realizado en las instalaciones del laboratorio del Dr. Javier Meana, en la Facultad de Medicina de la Universidad de País Vasco.

### 1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los diversos estudios realizados se centraron en la corteza prefrontal de los animales, debido a que es una estructura cerebral con altos niveles de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios susceptibles a los estímulos neuroinflamatorios/inmunes como el LPS y el estrés. Además, los déficits cognitivos y las alteraciones neuronales que se inducen en la corteza prefrontal han sido descritos en diversas enfermedades mentales como la esquizofrenia (*rev. en Volk y Lewis, 2010*).

Los antipsicóticos atípicos empleados median sus efectos principalmente a través del bloqueo de los receptores  $5\text{-HT}_{2A/2C}$  y de los receptores dopaminérgicos D2. Las dosis de estos fármacos fueron escogidas en base a estudios *in vivo* previos en ratas Wistar jóvenes teniendo en cuenta la farmacocinética, farmacodinamia y la ocupación

de los receptores D<sub>2</sub> (Naiker et al., 2006; Dremecov et al., 2007 a,b; Olsen et al., 2008; Choi et al., 2010). De igual manera, se tuvieron en cuenta el efecto sobre vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo, los niveles de citoquinas y la plasticidad sináptica en la corteza prefrontal (Corena-McLeod et al., 2008).

Los fármacos administrados se diluyeron en el vehículo (Veh), que consistía en una solución salina 0.9% con tween 20 al 0.1%. Para obtener la dosis deseada se realizó una solución stock de cada fármaco disuelto en una solución salina con 0.26mM de ácido acético. Mediante cálculos estequiométricos se determinó el volumen de la solución stock a diluir en el vehículo para cada procedimiento.

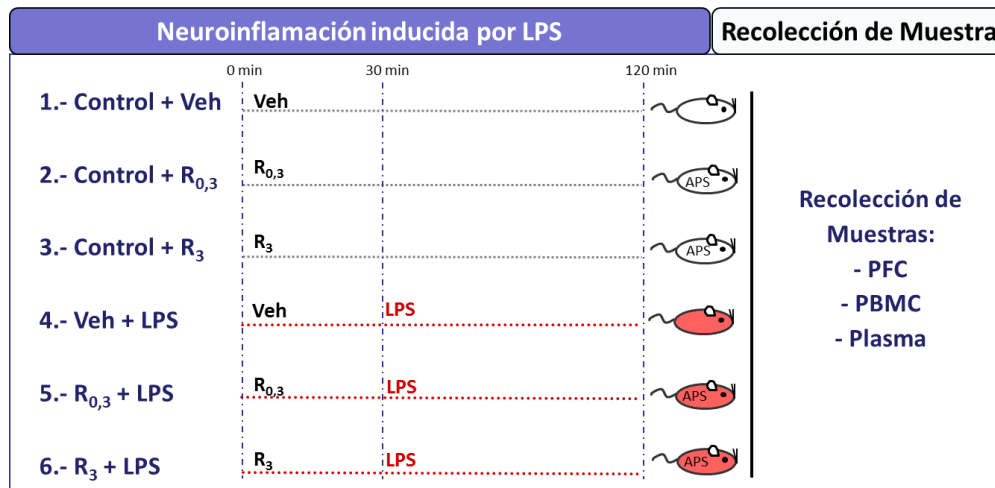
Se utilizaron como herramientas farmacológicas: Risperidona (MW: 410.48, donada por Janssen Cork, Bélgica) a dosis de 0.3mg/kg y 3mg/kg; Paliperidona (MW: 426.48, ref.P0099, Sigma) a dosis de 0.05mg/kg, 0.3mg/kg y 1mg/kg. (Nasrallah et al., 2010; McNamara et al., 2011; Richtand et al., 2011; Kumar et al., 2015; Lian et al., 2015).

#### **1.1.1. BLOQUE 1: ESTUDIO DEL EFECTO DE RISPERIDONA Y PALIPERIDONA SOBRE EL BALANCE PROINFLAMATORIO/ANTIINFLAMATORIO EN UN MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN AGUDO INDUCIDO POR LPS.**

Para este primer estudio se utilizó un modelo neuroinflamatorio inducido por la administración de LPS a una dosis no endotóxica. El LPS es un potente inmunoestimulante que promueve un estado proinflamatorio en el organismo a través de la activación de la vía del TLR4 y la traslocación nuclear de NFκB. Además, tanto a nivel del SNC como a nivel periférico, el LPS bajo determinadas condiciones, aumenta la susceptibilidad al daño o muerte celular, lo que la hace útil para el estudio de posibles estrategias terapéuticas antiinflamatorias y/o neuroprotectoras como los aquí propuestos (Ambrosini, 2005).

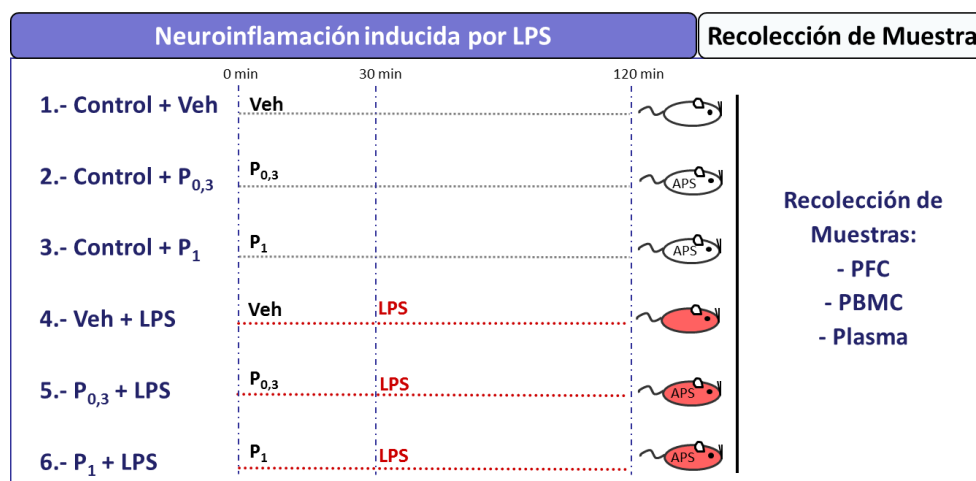
En este bloque de experimentos, se utilizó RSP a dosis de 0.3mg/kg y 3mg/kg; y PALI a dosis de 0.3mg/kg y 1mg/kg. Además se usó LPS (*Escherichia coli* serotipo 0111:B4, ref. L2630, Sigma) a una dosis de 0,5mg/kg. Todas las administraciones se realizaron por vía intraperitoneal.

Para evaluar los efectos de RSP sobre el modelo neuroinflamatorio se realizó el siguiente diseño experimental, separando aleatoriamente a los animales en 6 grupos (Fig.18). El grupo control recibió el vehículo utilizado para disolver los antipsicóticos y el LPS (n=8), al segundo grupo se le administró la menor dosis de RSP (0,3mg/kg, R<sub>0,3</sub>) (n=6), y al tercero la dosis mayor (3mg/kg, R<sub>3</sub>) (n=6), el cuarto grupo corresponde al modelo neuroinflamatorio *per se*, el cual recibió el LPS a una dosis no endotóxica de 0,5mg/kg (n=8), de igual manera los últimos dos grupos también recibieron LPS, pero 30 minutos antes se les administró un pretratamiento con RSP a dosis de 0,3mg/kg para el quinto grupo (n=8), y de 3mg/kg para el sexto grupo (n=8). Los animales a los que no se les administró LPS fueron manipulados brevemente.



**Figura 18.** Diseño experimental de los efectos de Risperidona en un modelo neuroinflamatorio inducido por LPS. Veh: vehículo; R<sub>0,3</sub>: Risperidona 0,3mg/kg; R<sub>3</sub>: Risperidona 3mg/kg; APS: antipsicótico; PFC: corteza prefrontal; PBMC: Células mononucleares de sangre periférica.

El mismo estudio se repitió para evaluar los efectos de PALI. El diseño experimental fue similar (Fig.19). El primer grupo recibió el vehículo (n=5), al segundo grupo se le administró PALI a una dosis menor (0,3mg/kg, P<sub>0,3</sub>) (n=5), y al tercero la dosis mayor (1mg/kg, P<sub>1</sub>) (n=5), el cuarto grupo corresponde al modelo neuroinflamatorio, el cual recibió el LPS a una dosis no endotóxica de 0,5mg/kg (n=5), de igual manera los últimos dos grupos fueron administrados con LPS, pero 30 minutos antes del LPS se les administró un pretratamiento con PALI a dosis de 0,3mg/kg para el quinto grupo (n=5), y de 1mg/kg para el sexto grupo (n=5). Los animales a los que no se les administró LPS fueron manipulados brevemente.



**Figura 19.** Diseño experimental de los efectos de Pliperidona en un modelo neuroinflamatorio inducido por LPS. Veh: vehículo; P<sub>0,3</sub>: Paliperidona 0,3mg/kg; P<sub>1</sub>: Paliperidona 1mg/kg; APS: antipsicótico; PFC: corteza prefrontal; PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

En este bloque de experimentos se evaluaron los niveles de las principales citoquinas proinflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  mediante ELISA y RT-PCR. De igual manera se estudió la vía proinflamatoria desencadenada por la traslocación del NF $\kappa$ B, mediante los niveles de mRNA por RT-PCR y proteico de las principales proteínas implicadas por Western Blot, al igual que los niveles de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub> mediante ELISA. Además, se estudiaron las consecuencias del proceso inflamatorio desencadenado mediante la medición de los niveles de peroxidación lipídica y de nitritos por espectrometría. Por otro lado, también se evaluó el estado de la vía antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$  mediante el estudio de los niveles de mRNA por RT-PCR, proteico por Western Blot, y de los niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub> mediante ELISA. Finalmente, los principales parámetros analizados en la corteza prefrontal, también fueron estudiados a nivel periférico en PBMC para las proteínas, y en plasma para los niveles de nitritos.

### 1.1.2. BLOQUE 2: ESTUDIO DEL EFECTO DE PALIPERIDONA EN UN MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDO POR ESTRÉS.

La exposición a estrés físico/psicosocial es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad psiquiátrica (Stahl, 2010). Brevemente, el estrés desencadena una respuesta neuroinflamatoria en donde convergen diversos

mecanismos, comenzando por la activación del eje hipotalámico hipofisiario adrenal (eje HHA). La posterior liberación de glucocorticoides y catecolaminas influirán en la actividad de las células del sistema inmune, estimulando la secreción de citoquinas proinflamatorias. De igual manera, el glutamato liberado durante el estrés, induce la secreción de citoquinas proinflamatorias, y la posterior activación de la vía del NFkB. Por otro lado, el estrés es capaz de activar la vía del TLR4, generando mayor inflamación.

Un modelo animal ampliamente usado en el estudio de patologías asociadas a estrés es el de movilidad restringida (*“restraint stress”*), consiste en inmovilizar a los animales introduciéndolos en conos de plástico tipo Decapicone® (Braintree, MA, EEUU), con forma de cono truncado que se ajusta al cuerpo de la rata, impidiendo el movimiento de las extremidades y de la cabeza, pero sin alterar la respiración ni impidiendo el movimiento de la cola (Magariños *et al.*, 1997; Leza *et al.*, 1998).

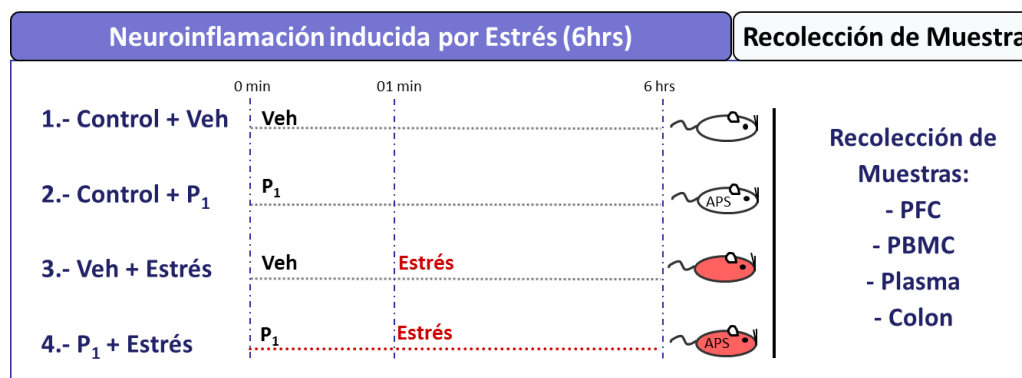
En este bloque de experimentos empleamos el modelo de movilidad restringida para el estudio del efecto de Paliperidona bajo condiciones neuroinflamatorias. Este modelo es agudo, inescapable debido a que el animal no puede evitar la exposición al agente estresante, impredecible debido a que no puede anticipar la aparición ni la duración del estrés y mixto físico-psicológico debido a la doble naturaleza del estímulo. Además es un modelo fácil de repetir y que se puede cronificar (Poland *et al.*, 1999). Cuando el modelo pasa a ser crónico (restricción del movimiento por seis horas al día, durante 21 días), el modelo puede clasificarse como inescapable, predecible y mixto físico-psicológico.

Por último, es un modelo que se ha utilizado tradicionalmente en nuestro grupo de investigación, de manera que existe un elevado dominio de la técnica y gran cantidad de resultados previos (García-Bueno *et al.*, 2008a; Gárate *et al.*, 2014).

Tras el periodo de habituación la inmovilización se inició a las 09.00 horas para evitar la influencia de los niveles bajos de cortisol. El estrés duró seis horas durante un único día en el caso del modelo agudo, y se repitió durante 21 días en el caso del modelo crónico.

Para la realización de este segundo bloque de experimentos, se utilizó como herramienta farmacológica PALI a una dosis de 1mg/kg ( $P_1$ ). Todas las administraciones se realizaron por vía oral.

Para evaluar los efectos de PALI sobre el modelo neuroinflamatorio agudo inducido por estrés, se separaron aleatoriamente los animales en 4 grupos (Fig.20). El primer grupo recibió el vehículo ( $n=5$ ), al segundo grupo se le administró PALI a una dosis de 1mg/kg( $P_1$ ,  $n=5$ ), el tercer grupo corresponde al modelo neuroinflamatorio *per se*, el cual recibió el vehículo y fue sometido al protocolo de estrés durante seis horas ( $n=5$ ), al cuarto grupo se le administró PALI 1mg/kg y fue sometido al mismo protocolo de estrés ( $n=5$ ). Los animales no sometidos a estrés fueron manipulados brevemente (sacando al animal de la jaula y volviendo a introducirlo en ella), y se les privó de alimento y agua durante el tiempo de experimentación para que todos los animales estuviesen bajo las mismas condiciones experimentales.

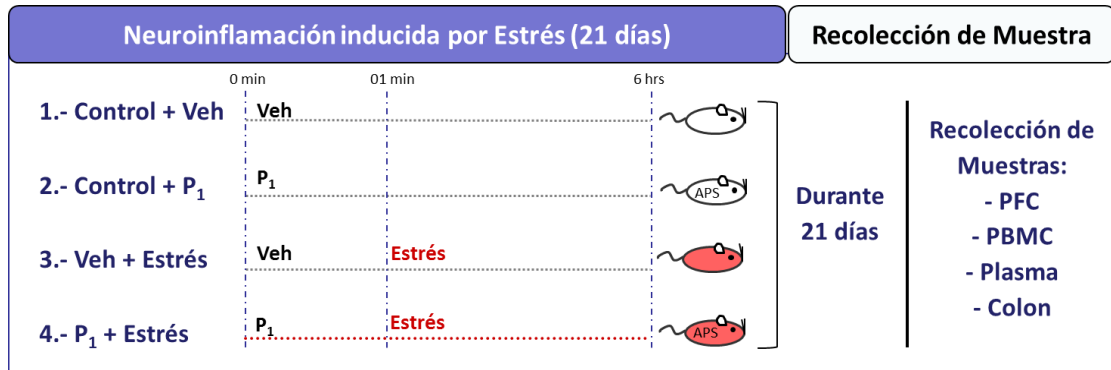


**Figura 20.** Diseño experimental de los efectos de Paliperidona en un modelo neuroinflamatorio agudo inducido por estrés. Veh: vehículo;  $P_1$ : Paliperidona 1mg/kg; APS: antipsicótico; PFC: corteza prefrontal; PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

De igual manera, para evaluar los efectos de PALI sobre el modelo neuroinflamatorio crónico inducido por estrés se realizó el siguiente diseño experimental (Fig.21), se separaron aleatoriamente los animales en 4 grupos. El primer grupo recibió el vehículo ( $n=6$ ), al segundo grupo se le administró PALI a una dosis de 1mg/kg ( $P_1$ ,  $n=6$ ), el tercer grupo corresponde al modelo neuroinflamatorio *per se*, el cual recibió el vehículo y fue sometido al protocolo de estrés durante seis horas ( $n=7$ ), al cuarto grupo se le administró PALI 1mg/kg y fue sometido al mismo protocolo de



estrés (n=7). Los animales a los que no se les sometió al protocolo de estrés fueron manipulados brevemente, y se les privó de alimento y agua durante el tiempo de experimentación.



**Figura 21.** Diseño experimental de los efectos de Paliperidona en un modelo neuroinflamatorio crónico inducido por estrés. Veh: vehículo; P<sub>1</sub>: Paliperidona 1mg/kg; APS: antipsicótico; PFC: corteza prefrontal; PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

En este segundo bloque de experimentos se realizaron las mismas determinaciones proinflamatorias/antiinflamatorias que en el primer bloque, tanto a nivel de PFC como a nivel periférico.

Por otro lado, también se evaluó en PFC la activación inmune a través de la vía de señalización del TLR4 mediante los niveles de mRNA y proteicos de sus principales proteínas. En este mismo ámbito se estudió la presencia de señales activadoras de la vía del TLR4 como el LPS mediante ELISA y de algunos DAMPs como HSP60/70 y HMGB1 mediante sus niveles de mRNA y proteicos; de igual manera se evaluó el estado inflamatorio intestinal mediante los niveles proteicos de las enzimas proinflamatorias inducibles iNOS y COX-2, y el primer mecanismo de defensa con que cuenta la barrera intestinal, para lo cual se midió los niveles de IgA presentes en el intestino por ELISA, y los niveles proteicos de la quimioquina CCL28 por Western Blot.

Siguiendo con el desequilibrio inflamatorio presente en el modelo animal y pretendiendo ahondar en las posibles propiedades antiinflamatorias del fármaco se procedió a estudiar una batería de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias mediante ELISA o sus niveles de mRNA. Se ha observado que según las citoquinas presentes en el ambiente, los macrófagos pueden desarrollar un perfil proinflamatorio

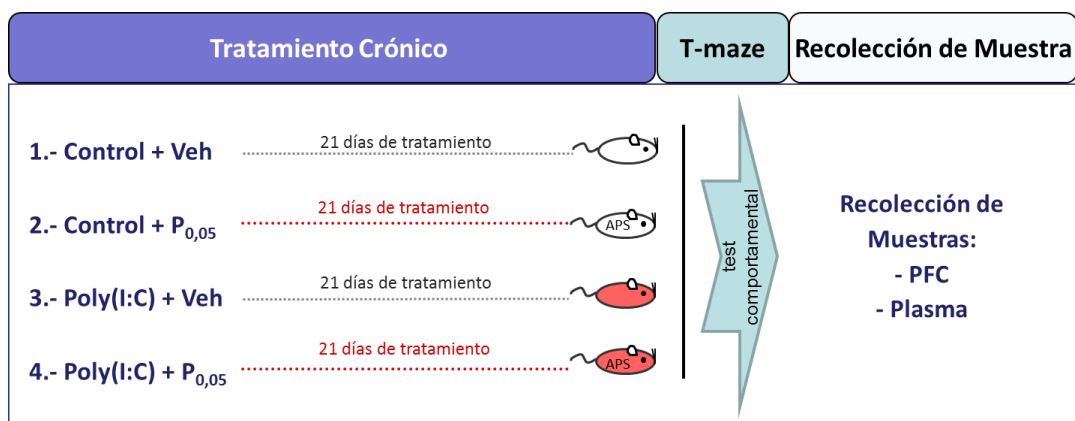
o antiinflamatorio, es por ello que en este apartado estudiamos algunos marcadores microgliales antiinflamatorios como Arg1 y FOLR2 mediante RT-PCR, Western Blot e inmunofluorescencia. De igual manera evaluamos la vía antioxidante del NRF2 mediante los niveles de mRNA y proteicos de sus principales elementos, al igual que de sus principales productos mediante RT-PCR.

Finalmente, dado el papel homeostático que juega el sistema endocannabinoide, se procedió a su estudio mediante los niveles de mRNA y proteicos de sus principales receptores CB1 y CB2, al igual que de algunos receptores alternativos como PPAR $\alpha$ , TRPV1 y GPR55. De igual manera, se estudió las principales enzimas participantes en el metabolismo de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

### **1.1.3. BLOQUE 3: ESTUDIO DEL EFECTO DE PALIPERIDONA EN UN MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUCIDO POR INFECCIÓN PRENATAL.**

Para el siguiente bloque de experimentos se utilizó uno de los modelos animales más utilizados para el estudio de la esquizofrenia. Teniendo en cuenta que no existe un modelo animal capaz de reproducir la totalidad de la sintomatología de dicha enfermedad psiquiátrica, uno de los modelos que más se le acerca es el de infección prenatal (*Meyer et al., 2005*). Mediante la administración del agonista de TLR3, Poly(I:C), durante el periodo gestacional, se genera una respuesta inmune inflamatoria potente (*Matsumoto y Seya, 2008*), capaz de afectar el neurodesarrollo en las crías de las madres infectadas, produciéndose alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica en las vías mesolímbicas y mesocortical, de igual manera la vía nigroestriatal (*Deleidi et al., 2010*) y la conectividad hipocampo-corteza prefrontal presentan alteraciones similares a la observada en los pacientes esquizofrénicos (*Dickerson y Bilkey, 2013*). Dentro de las alteraciones cognitivas se ha demostrado que los animales expuestos a la infección materna presentan déficits sensomotores, problemas de memoria/aprendizaje y atención; además éstos animales suelen desarrollar ansiedad, con disfunción social similar al presentado en la sintomatología de la esquizofrenia (*Meyer et al., 2008; Eyles et al., 2012; Reisinger et al., 2015*).

Para la realización de este modelo se usaron ratones de la cepa C57BL/6J, a las ratonas preñadas se les administró poly(I:C) (5mg/kg i.p en solución salina) en el noveno día gestacional (*Borçoi et al., 2015*). Tras el nacimiento de la progenie, los ratones siguieron un desarrollo bajo condiciones normales con libre acceso a comida y agua. El deterioro cognitivo se hace patente alrededor de la octava semana de vida (adolescencia), momento en el cual son utilizados para nuestro diseño experimental (Fig.22). Se realizaron cuatro grupos de ratones procedentes de madres expuestas al poly(I:C) o al vehículo, los cuales se trataron durante 21 días con PALI a una dosis de 0,05 mg/kg i.p. o bien con el vehículo. El primer grupo recibió el vehículo (n=8), al segundo grupo se le administró PALI a una dosis de 0,05mg/kg ( $P_{0,05}$  n=3), el tercer grupo corresponde al modelo animal de esquizofrenia *per se*, el cual recibió el vehículo durante 21 días (n=9), al cuarto grupo se le administró PALI 0,05mg/kg durante 21 días (n=8). Transcurridas 24 horas desde la última dosis administrada se evaluó el deterioro cognitivo mediante el test de comportamiento T-maze, donde queda de manifiesto el aprendizaje y la memoria del individuo.



**Figura 22.** Diseño experimental de los efectos de Paliperidona en un modelo animal de esquizofrenia. Veh: vehículo;  $P_{0,05}$ : Paliperidona 0,05mg/kg; APS: antipsicótico; PFC: corteza prefrontal.

En este último bloque de experimentos se utilizó PFC para el estudio de diversas citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL1 $\beta$ , IL6, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  y TNF $\alpha$ , al igual que otras antiinflamatorias como IL10, y TGF $\beta$ . En este mismo tejido se estudió la vía inflamatoria orquestada por NF $\kappa$ B mediante los niveles de mRNA por RT-PCR y los niveles proteicos por Western Blot. También se midieron las consecuencias de daño

del proceso inflamatorio mediante la medición de los niveles de peroxidación lipídica y los niveles de los nitritos por espectrometría.

Por otro lado, también se evaluó en PFC la activación inmune a través de la vía de señalización del TLR3 mediante los niveles de mRNA y proteicos de sus principales proteínas.

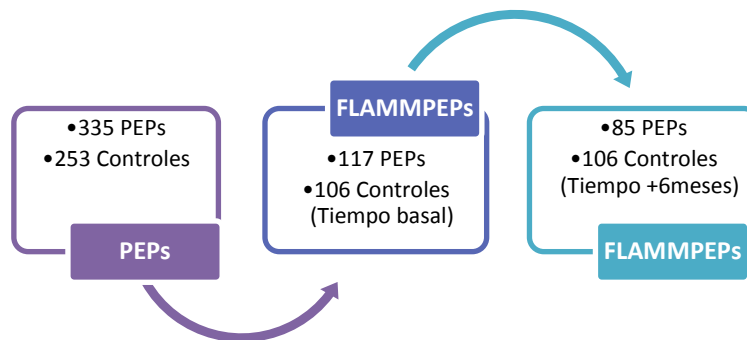
Al igual que en los estudios anteriores se analizaron las propiedades antiinflamatorias del fármaco en el modelo de infección prenatal. Se evaluó la vía antiinflamatoria L-PGDS/PPAR $\gamma$  mediante el estudio de los niveles de mRNA y proteico de las proteínas implicadas por Western Blot. También se estudiaron los marcadores microgliales antiinflamatorios Arg1 y FOLR2 mediante RT-PCR y Western Blot. De igual manera se evaluó la vía antioxidante del NRF2 mediante los niveles de mRNA y proteicos de sus principales elementos, al igual que de sus principales productos de respuesta antioxidante mediante RT-PCR.

Posteriormente, se estudió el efecto del tratamiento sobre el sistema endocannabinoide mediante los niveles de mRNA y proteicos del receptor CB1, y de las principales enzimas participantes en el metabolismo de los endocannabinoides AEA y 2-AG.

## 2. MUESTRAS HUMANAS (ESTUDIO PEPs & FLAMMPEPs).

La población de estudio pertenece a un estudio español longitudinal, multicéntrico, y prospectivo llamado “PEPs”, acrónimo de “Interacción genotipo-fenotipo y ambiente. Aplicación a un modelo predictivo en primeros episodios psicóticos”. Dicho estudio fue diseñado para evaluar diversas variables clínicas, neuropsicológicas, bioquímicas, de neuroimagen, farmacogenéticas y del medio ambiente en 300 pacientes con un primer episodio psicótico y sus respectivos controles sanos pareados por edad, sexo y estatus socio-económico. La finalidad de este proyecto era formular modelos predictivos de funcionalismo con genes que ayuden a la identificación y tratamiento precoz de la enfermedad, de igual manera buscaba estudiar el patrón de inicio precoz y su relación con patrones de riesgo. Dicho proyecto contó con la participación de 16 centros de salud, 14 de los cuales pertenecían al Centro de investigaciones Biomédicas en Red en Salud Mental (CIBERSAM), la red de española de investigación traslacional en enfermedades mentales.

Aprovechando la infraestructura, los recursos humanos y técnicos del proyecto clínico PEPs, se realizó un subestudio con ocho de los grupos participantes, llamado “FLAMMPEPs”, acrónimo de “Alteraciones inflamatorias en Esquizofrenia, búsqueda de marcadores biológicos en primeros episodios psicóticos”, cuyo objetivo principal era identificar posibles marcadores biológicos en fuentes y dianas bioquímicas de las vías oxido/nitrosativas e inflamatorias en los primeros episodios psicóticos. Para ello se utilizó una subpoblación del estudio PEPs de 117 pacientes con un primer episodio psicótico y 106 controles sanos pareados por los criterios anteriormente mencionados, durante el primer episodio psicótico se recogió una muestra de sangre para extraer las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) , el procedimiento se repitió de igual manera en los controles. 85 de los pacientes fueron seguidos durante 6 meses, momento en el cual se recogió una segunda muestra de sangre para analizar su evolución (Fig.23).



**Figura 23.** Diagrama de la población de estudio

Los criterios de inclusión de pacientes fueron: tener entre 7 y 35 años de edad en el momento de la primera evaluación, presentar una sintomatología psicótica durante menos de un año, y hablar español correctamente. Por otro lado, los criterios de exclusión de los pacientes fueron tener retraso mental según los criterios del DSM-IV (*American Psychiatric Association, 1994*), tener trastorno de depresión mayor, haber sufrido un trauma craneoencefálico con pérdida de conciencia, o una enfermedad orgánica con repercusiones mentales.

Los criterios de inclusión para los controles fueron: tener el mismo género que los pacientes, edad similar  $\pm 10\%$ , tener un estatus socioeconómico similar, no tener ni haber tenido una enfermedad psiquiátrica según los criterios del DSM-IV, hablar correctamente español, y no contar con un familiar de primer grado con historial de trastornos psicóticos. Los criterios de exclusión fueron los mismos utilizados con los pacientes.

Ninguno de los pacientes y controles presentó infecciones, alergias, fiebre u otras enfermedades graves como cáncer o autoinmune, ni estaban recibiendo inmunosupresores, o vacunas en los seis meses previos, ni tampoco estaban consumiendo antiinflamatorios o analgésicos dos días antes al momento de la extracción de sangre.

El estudio fue aprobado por los comités éticos de los centros de salud participantes. Los participantes del mismo firmaron un consentimiento informado según la declaración de Helsinki II, y en el caso de los menores de edad, dicho consentimiento fue firmado por el tutor legal.

Los pacientes adultos fueron diagnosticados según los criterios del DSM-IV y para los menores de edad la entrevista diagnóstica se basó en la escala K-SADS-PL (programa para trastornos afectivos y esquizofrenia en los niños en edad escolar) (Ulloa *et al.*, 2006). Dentro de las escalas utilizadas para la evaluación psicopatológica están la de los síntomas positivos y negativos (PANSS), la de manía de Young (YMRS) (Young *et al.*, 1978) y la de depresión de Montgomery-Asberg (MADRS) (Montgomery *et al.*, 1979). Para evaluar el nivel de funcionamiento se usó la escala de evaluación global del funcionamiento (GAF) (Endicott *et al.*, 1976) y la de evaluación global de niños (C-GAS) (Shaffer *et al.*, 1983). A su vez la valoración clínica incluyó una exhaustiva examinación física y del historial médico. Se valoró el consumo de tabaco, cannabis, y otras drogas de abuso.

### 3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

En los modelos de neuroinflamación inducidos por LPS y estrés los animales fueron sacrificados por administración intraperitoneal de una dosis letal de pentobarbital sódico (320mg/kg, Vetoquinol®) 90 minutos después de la administración de LPS o el vehículo en el modelo de neuroinflamación inducida por LPS, o inmediatamente después de la última sesión de estrés. En el caso del modelo de esquizofrenia por infección prenatal los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Tras observar la ausencia de movimientos respiratorios y de reflejos al pinzar las patas traseras se procedió a la toma de muestras.

#### 3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS EN FRESCO.

**a) Plasma:** En los animales la sangre se extrajo mediante la apertura de la cavidad torácica seguida de una punción cardíaca. La sangre extraída se mezcló inmediatamente con el anticoagulante citrato sódico (3.15% p/v; 1 vol. de citrato por 9 vol. de sangre). Posteriormente la mezcla de sangre fue centrifugada a 1800rpm a 4°C por 10 minutos (Labofuge 400R, Heraeus), se recogió el plasma sobrenadante y se almacenó a -80°C para futuras determinaciones.

En el caso de los pacientes se extrajeron 10ml de sangre venosa en tubos que contenían como anticoagulante EDTA. Las extracciones se realizaron en ayunas entre las 8 y las 10 AM. La sangre fue centrifugada a 1800rpm a 4°C por 10 minutos, se recogió el plasma sobrenadante y se almacenó a -80°C para futuras determinaciones.

Con los restos de sangre se procedió a extraer las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

**b) PBMCs:** Los restos de sangre que quedaron después de la aspiración del plasma fueron diluidos 1:2 con el medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen, GB). Por cada ml de mezcla se usaron 0.65ml de Ficoll-Paque® (GE Healthcare, Suecia) para crear un gradiente de concentración y sobre esta capa de Ficoll se depositó cuidadosamente la mezcla de sangre y RPMI. Para realizar la separación celular se centrifugó durante 40 minutos a temperatura ambiente a 800g con aceleración y desaceleración suave. Se absorbe la fase de PBMC junto con el medio RPMI y se diluye con igual volumen de medio RPMI, nuevamente se centrifuga a 1116g durante 10 min y se decanta el sobrenadante dejando solo el pellet que se almacena a -80°C para estudios posteriores.

**c) Colon descendente:** El tracto gastrointestinal presenta gran cantidad de TLR4 (*Ortega-Cava et al., 2003*), y además es una estructura que se puede alterar mediante estímulos estresantes, llegando a causar un aumento en la permeabilidad intestinal. A los animales sujetos a los modelos de estrés se les extrajo 2cms de colon distal (entre el recto y el ángulo esplénico). Se limpió de heces, se congeló en hielo seco y posteriormente se almacenó a -80°C.

**d) Corteza Prefrontal (PFC):** Tras la decapitación con guillotina para las ratas, o con tijeras en el caso de los ratones, se eliminaron las meninges y se extrajo el cerebro de la bóveda craneal. La corteza prefrontal de cada hemisferio se subdividió en tres trozos que fueron congelados inmediatamente en nieve carbónica y almacenados a -80°C para futuras determinaciones.

La corteza prefrontal de rata y ratón presenta elevados niveles de mediadores proinflamatorios (entre ellos NFκB, iNOS, COX-2) y anti-inflamatorios (como PPARγ), es por ello que se considera como un área susceptible de desarrollar procesos



neuroinflamatorios inducidos por estrés (*García-Bueno et al., 2008a*). Además la corteza prefrontal participa en la regulación del eje HHA durante la respuesta a estrés (*Radley et al., 2006*). Por otro lado, se ha observado que diversos tipos celulares presentes en la corteza prefrontal expresan TLR-4 tras la exposición a diferentes estímulos inmunes/inflamatorios como: neuronas corticales (*Tang et al., 2008*), astrocitos (*Caso et al., 2007*), microglía (*Olson y Miller, 2004; Jou et al., 2006*) y células endoteliales (*Singh y Jiang, 2004; Nagyoszi et al., 2010*). Por último, es una región de asociación que recibe información de la mayoría de las estructuras del cerebro, es aquí donde gran cantidad de los procesos cognitivos ejecutivos tienen lugar, y cuyo deterioro morfológico y/o neuroquímico se asocia a diversas enfermedades mentales.

### **3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS FIJADAS PARA ESTUDIOS MICROSCÓPICOS.**

La extracción y preparación del tejido cerebral para inmunofluorescencia se realizó mediante la perfusión con paraformaldehído al 4%.

Los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico como se describe anteriormente. Se abre la cavidad torácica y se introduce la guía de la bomba de perfusión en el ventrículo izquierdo. Luego se hace una escisión en la aurícula derecha y se procede a perfundir una solución salina estéril (0,9%) como solución lavadora vascular. A continuación, se perfundió la solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,2M y pH 7,4 a temperatura ambiente. Se extrajeron los cerebros y se post fijaron por inmersión en paraformaldehído durante cuatro horas a 4°C. Por último se crioprotegieron por inmersión en una solución de KPBS 0,1M con sacarosa al 30% a 4°C durante 2 días. Los cerebros fueron cortados con un micrótopo (Leica SM 2000R, España) en secciones frontales de 30µm de grosor, posteriormente los cortes se almacenaron a -40°C en una solución anticongelante hasta el momento de su uso.

## 4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.

### 4.1 OBTENCIÓN DE HOMOGENIZADO TOTAL.

Los segmentos de PFC destinados a la realización de homogenizado total fueron sonicados (Digital Sonifier, Branson) en 400µl de cóctel de homogenización formado por tampón PBS pH 7,4 con inhibidores de proteasas (Complete<sup>®</sup> Proteasa Inhibitor Mixture, Roche Diagnostics, Alemania). En el caso del colon, los trozos fueron homogenizados por el procedimiento mecánico de vidrio-teflón en la misma solución que los PFCs. Los homogenizados resultantes fueron centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4°C, se recogieron los sobrenadantes para determinar el contenido proteico mediante el método de Bradford y se almacenaron para futuros experimentos de western blots.

### 4.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS.

La extracción se realizó según el método de Schreiber (1989) con algunas modificaciones. Los trozos de PFC aislados para esta finalidad se homogenizaron con 300µl de tampón de lisis consistente en: HEPES 10mmol/L a pH 7,9, con cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), EDTA (1mM), EGTA (1mM), KCl (10mM), NaF (5mM), NaVO<sub>4</sub> (1mM), sacarosa (0.5M) y Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (10mM). Las muestras se incubaron en hielo durante 15 minutos y se añadió el detergente Nonidet P-40 (Roche, Alemania) a una concentración de 0,5%. Los tubos fueron agitados durante 30 segundos y la mezcla se centrifugó a 8000g durante 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante que constituye la “fracción citosólica”, por otro lado el pellet resultante se resuspendió en 80µl de tampón suplementado con glicerol al 20% y KCL 0.4M, se agitaron durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12000g para recoger el sobrenadante y obtener la “fracción nuclear”. Ambas fracciones se almacenaron a -80°C para futuros estudios.

Para la extracción de núcleos y citosoles desde PBMC se siguió el mismo protocolo, pero con la salvedad de que los volúmenes de los tampones utilizados fue menor. Para la extracción de la fracción citosólica se utilizaron 150 µl de tampón de lisis, y posteriormente 50 µl del tampón de extracción para la obtención de la fracción nuclear.

#### 4.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA.

Las muestras utilizadas en los protocolos de Western Blot, cuantificación de Malondialdehído, cuantificación de nitritos y determinaciones en tejido mediante ELISAS fueron previamente cuantificadas para conocer su contenido proteico.

Para ello se siguió el método de Bradford<sup>®</sup>, el cual se basa en la capacidad de las proteínas de unirse a determinados colorantes. En este caso el colorante azul brillante G-250 coomasie en presencia de ácido fosfórico se adhiere a la proteína, tornándose en otro color que puede ir desde marrón claro a azul intenso, cuya máxima absorción se mide a los 570-590 nm y es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. Como curva patrón se utilizaron concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina con siete puntos entre 0 y 0,8mg/ml. Para las mediciones se diluyeron las muestras, en el caso del homogenizado total se diluyó 1/80, para los extractos provenientes de tejidos la dilución fue 1/40 y 1/20 para los provenientes de PBMC. Se mezclaron 10 µl de la dilución o estándar con 200 µl del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia con un lector de placas (Synergy 2, BioTek, Alemania).

#### 4.4 WESTERN BLOT (WB).

Los homogenizados y extractos citosólicos/nucleares de las distintas muestras fueron ajustados según su contenido proteico a 2 µg/µl, y se mezclaron con igual volumen de tampón de carga (Laemmli<sup>®</sup> Buffer con 5% de β-mercaptoetanol), alcanzando una concentración final de 1 µg/µl.

En los geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida de porcentaje variable (según el peso molecular de la proteína a estudiar) y 1.5mm de grosor, se cargaron entre 10 y 20 µg de muestra según la proteína a estudiar. La electroforesis se realizó a 100 voltios hasta la completa migración de las proteínas en un sistema Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell (BioRad, España). Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare, España) por transferencia semiseca a 24mA (Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, España) durante 30 a 120 minutos según el peso molecular de la proteína y la cantidad de geles a transferir. En ocasiones se usaron para la transferencia packs comerciales de membranas de nitrocelulosa con un poro de

0.2µm, Transfer Packs y se realizó una transferencia semiseca rápida de 3 a 10 minutos usando el sistema Trans-Blot® Turbo™ (BioRad, España). Las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA; Merck) al 5% en TBS-tween o leche desnatada al 5% en TBS-tween durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C bajo condiciones específicas para cada proteína resumidas en la tabla 1. Luego de tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-tween, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos durante 90 minutos (tabla 2). Antes de proceder al revelado de las bandas se lavó nuevamente tres veces con TBS-tween durante 10 minutos cada uno.

Las bandas proteicas reconocidas por los anticuerpos se revelaron mediante un kit ECL Plus® de quimioluminiscencia (Amersham, Suecia) y visualizadas en películas de rayos X o bien mediante el detector Odyssey® FC (Licor, Alemania). Las imágenes obtenidas por ambos métodos se cuantificaron mediante la densitometría de las bandas (Image J, NIH, EEUU).

Como control de carga se utilizaron las proteínas β-actina para los homogenizados totales y los extractos citosólicos, y por otro lado, GAPDH y HDAC1 para los extractos nucleares.

Proteína (peso kDa)	Tipo de muestra	Acrilamida	Anticuerpo 1° (dilución)	Anticuerpo 2°(dilución)
<b>TLR-4</b> (89 kDa)	Homogenizado PFC	8%	sc-16240 (1:750 BSA 1%)	α-Goat (1:4000)
<b>MD-2</b> (20 kDa)	Homogenizado PFC	14%	sc-20668 (1:500 BSA 2,5%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>MyD88</b> (35 kDa)	Homogenizado PFC	8%	ab2064 (1:750 BSA 5%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>IκBα</b> (36 kDa)	Extracto Citoplasmático	8%	sc-371 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>NFκB</b> (65 kDa)	Extracto Nuclear	8%	sc-372 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>COX-2</b> (72 kDa)	Homogenizado PFC/Colon	8%	sc-1747 (1:750 BSA 2,5%)	α-Goat (1:4000)
<b>mPGES1</b> (16 kDa)	Homogenizado PFC	14%	CAY 10004350 (1:1000 BSA 1%)	α-mouse (1:2000)
<b>iNOS</b> (130 kDa)	Homogenizado PFC/Colon	8%	sc-650/ sc-651 (1:750 BSA 1%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>CCL28</b> (15 kDa)	Homogenizado Colon	14%	R&D AF533 (1:500 BSA 2,5%)	α-Goat (1:4000)
<b>HSP60</b> (60 kDa)	Homogenizado PFC	8%	sc-13966 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)

<b>HSP70</b> <b>(70 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	sc-1060 (1:1000)	α-Goat (1:4000)
<b>HMGB1</b> <b>(30 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	sc-26351 (1:1000)	α-Goat (1:4000)
<b>PPARγ</b> <b>(54 kDa)</b>	Extracto Nuclear	8%	sc-7196 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>L-PGDS</b> <b>(23 kDa)</b>	Homogenizado PFC	14%	CAY 160003 (1:1000 BSA 1%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>CB1</b> <b>(53 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	ab23703 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>CB2</b> <b>(45 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	CAY 101550 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>PPARα</b> <b>(55 kDa)</b>	Extracto Nuclear	8%	sc-9000 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>TRPV1</b> <b>(100 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	sc-12498 (1:750 BSA 0,5%)	α-Goat (1:4000)
<b>GPR55</b> <b>(37 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	ab174700 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>NAPE</b> <b>(45k Da)</b>	Homogenizado PFC	8%	CAY 10306 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>DAGLα</b> <b>(120 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	sc133307 (1:750 BSA 1%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>FAAH</b> <b>(66 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	CAY 101600 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>MAGL</b> <b>(35 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	CAY 100035 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>FOLR2</b> <b>(35 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	ab103998 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>ArgI</b> <b>(37 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	ab91279 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>TLR3</b> <b>(103 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	ab62566 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>TRIF</b> <b>(66 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	ab13810 (1:1000 BSA 0,5%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>PI3K</b> <b>(110kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	sc7189 (1:1000 BSA 1%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>AKT</b> <b>(60/62 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	#4691 (1:2000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>pAKT</b> <b>(60/62 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	#4060 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>KEAP1</b> <b>(64 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	MAB3024 (1:1000)	α-mouse (1:2000)
<b>NRF2</b> <b>(62 kDa)</b>	Extracto Nuclear	8%	sc722 (1:1000 BSA 1%)	α-Rabbit (1:2000)
<b>β-actina</b> <b>(42kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	A5441 (1:15000)	α-mouse (1:20000)
<b>HDAC1</b> <b>(60 kDa)</b>	Extracto Nuclear	8%	sc7872 (1:1000)	α-Rabbit (1:2000)
<b>GAPDH</b> <b>(35 kDa)</b>	Homogenizado PFC	8%	G8795 (1:5000)	α-mouse (1:5000)

**Tabla 2.** Resumen de anticuerpos utilizados. sc, Santa Cruz®; CAY,Cayman Europe®; #, Cell Signaling®; ab, abcam; R&D, R&D®; PFC, corteza prefrontal

#### 4.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

**a) Extracción de RNA:** En un ambiente de completa esterilidad, las muestras de corteza se homogenizaron con 350 µl de Trizol<sup>®</sup> mediante la acción mecánica con bolas de acero a fuerte agitación en un TissueLyser (Quiagen, España). Se traspasa el homogenizado total y se agregan 100 µl de cloroformo (Sigma). Tras agitarse unos segundos se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Se recoge la fase superior transparente, a la cual se le añade nuevamente 200 µl de Trizol<sup>®</sup> y 40 µl de cloroformo. Nuevamente se pasan unos minutos por vortex y se centrifuga para recuperar la fase superior transparente. A dicha fase se le agregan 300 µl de 2-Propanol (Sigma), se agita en vortex y se deja reposar a 4°C durante toda la noche. A continuación se centrifugan las muestras a 12000g durante 10 minutos a 4°C y se obtiene un pellet de RNA. Se elimina el sobrenadante y se lava el pellet tres veces con etanol frío al 80% (diluido con agua DEPC, libre de DNAsas y RNAsas). Por último, se decanta el sobrenadante y se deja secar el pellet, para luego resuspender en 50 µl de agua DEPC, se agita en vortex y almacena a -80°C.

**b) Cuantificación y Calidad del RNA:** En un ambiente estéril se determinó la cantidad de RNA y la pureza del mismo mediante el ratio 260/280 nm. Para ello se utilizó la placa Take-3 del lector de placas multimodal Synergy 2 (Biotek, Alemania). Se consideraron óptimas las muestras con un ratio de pureza 260/280 entre el rango 1.7 a 2.2.

**c) Retrotranscripción:** Bajo condiciones de esterilidad, se diluyeron las muestras con agua DEPC, según la concentración de RNA presente en las muestras para obtener una concentración de 1 µg de RNA en un volumen final de 10 µl. A dicha dilución se le añadieron 5x RT Buffer, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) 25mM, Random Primers, Inhibidor de RNAsas y agua DEPC. La mezcla se sometió a un corto protocolo de termociclador (My Cyclor™, BioRad) consistente en 1min a 95°, 8 min a 70° y 1min a 42°. Posteriormente se agregó una segunda mezcla a los tubos que contenía la Transcriptasa reversa (Invitrogen, España) y nuevamente se sometió a un protocolo en el termociclador consistente en 1 hora a 42°C, de esta manera tiene a lugar la síntesis de cDNA a partir de un molde de RNA. Finalmente se añaden 80 µl de agua DEPC y se almacenan a -40°C para futuros experimentos.

**d) RT-PCR:** Para medir la expresión de diversos genes se realizaron PCRs a tiempo real (Reacciones en Cadena de la Polimerasa). De esta manera se puede amplificar una secuencia de ácido nucleico específica, y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación, permitiendo comparar entre sí muestras distintas. Dicha cuantificación es posible gracias a la presencia de un fluoróforo que se intercala inespecíficamente entre las bases del cDNA, por lo que cada vez que se amplifica la secuencia la emisión de fluorescencia aumenta al unirse al cDNA. Dicha emisión es cuantificable al final de cada ciclo de amplificación. El fluoróforo utilizado durante esta tesis es el SYBRGreen, el cual es excitado a una longitud de onda de 488nm y emite a 522nm. En nuestro caso, la técnica es semi-cuantitativa, y relativa a los niveles de mRNA de tubulina y GAPDH, usados como genes de carga para normalizar las PCRs.

Se mezclaron 2 µl del cDNA obtenido en la retrotranscripción con 18 µl del Master Mix que contenía agua DEPC, los partidores específicos de cada gen estudiado (primers), y la Taq Polimerasa comercial con SYBRGreen (Biotools, España).

Posteriormente las muestras fueron sometidas a un protocolo estandarizado de PCR que varía únicamente en la cantidad de ciclos de amplificación según cada gen de estudio. En primer lugar se sometió durante 3 minutos a 95°C para romper los puentes de hidrógeno y separar las hebras del cDNA, luego vienen una serie de entre 28 a 40 ciclos según corresponda de: 10 segundos a 95°C para desnaturalizar la cadena, seguidos de 15 segundos a 60°C para que se produzca el alineamiento específico de los partidores, y por último 20 segundos a 72°C para que se produzca la elongación de la nueva cadena. Finalmente, se someten durante 20 segundos a 72°C para fusionar las cadenas. La temperatura de fusión de los productos obtenidos está entre los 50 y 90°C.

El diseño de los partidores se realizó a partir de las secuencias específicas de RNA mensajero para cada proteína y especie, disponibles en la base de datos de nucleótidos del NCBI (*"National Center for Biotechnology Information"*). Para la confección de los partidores se utilizó la herramienta *"Pick Primers"* disponible en el NCBI, que a su vez busca posibles hibridaciones con otras regiones similares mediante un análisis BLAST, permitiendo elegir partidores complementarios sólo a la secuencia estudiada. Para corroborar la especificidad de los partidores se realizaron PCRs *in-*

*silico*, una forma de PCR virtual usando la base de datos de la Universidad de California (UCSC Genome Browser software).

En la siguiente tabla se resumen los partidores utilizados en esta Tesis:

Gen	Partidor Directo 5`-> 3` (forward)	Partidor Inverso 5`-> 3` (reverse)
<b>RATA</b>		
TLR-4	ACATCAGAGGAAGAACAAGAAGCA	CGGAAATTGTAAACATAATGGGTTT
MD-2	CATAGAATTGCCGAAGCGCAAGGA	ACACATCTGTGATGGCCCTTAGGA
MyD88	AAGTTTGCTCTCAGCCTGTCTCCA	TGCAAGGGTTGGTATAGTCGCAGA
IkBα	TGGCCTTCCTCAACTTCCAGAACA	TCAGGATCACAGCCAGCTTTCAGA
NFκB	CATGCGTTTCCGTTACAAGTGCGA	TGGGTGCGTCTTAGTGGTATCTGT
COX-2	CTTCGGGAGCACAACAGAG	GCGGATGCCAGTGATAGAG
mPGE51	GGTGAAGCAAATGTTCCAGCTCA	TTAGCGGTTGGTCAAAGCCCATC
iNOS	GGACCACCTCTATCAGGAA	CCTCATGATAACGTTTCTGGC
HSP60	ACCTGTGACAACCCCTGAAG	TGACACCTTTTCTTCCAACC
HSP70	CAAGATCACCATCACCACG	TAGGACTCGAGCGCATTCTT
HMGB1	TGTAATGCCTTTGCCCTTCT	AAGCAAATGGCTTGGACAAC
PPARγ	ACCAACTTCGGAATCAGCTC	AGGCTCTACTTTGATCGCAC
L-PGDS	CTTGGGTCTCTTGGGATTTC	GTTGTAGGTGTACTGTCCGGGAAC
CB1	GCTGCAATCTGTTTCTCGGACAT	CACAATGAACAGCAGCAGCACACT
CB2	ACCTTGACCTTCTGCTGTGTCT	AAGAGGCAAGGGAAGCTGAGTTGA
PPARα	TCACACAATGCA ATCCGT TT	GGCCTTGACCTTGTTCATGT
TRPV1	AGCAGCAGTGAGACCCCTAA	CCTCCACAGGCCGATAGTA
NAPE	AGAAGTGTGGCTGTGAGAACGTGA	AACCTTGTTGTCATCCAGGAGGGT
DAGLα	AGTGATCTGACCATCGCCCTTCA	ACTGTTGAGCAGGGTGGTTATGGA
FAAH	AGCACTTGTTACCTTGGACCCTA	TGGGTAAGAAGGGAATCAGCGTGT
MAGL	AAGGTGCCTACCATGTTCTCCACA	AGCTGGTTCCCTAGACAGCACATT
IL1β	ACCTGCTAGTGTGTGATGTTCCCA	AGGTGGAGAGCTTTCAGCTCACAT
TNFα	CTGGCCAATGGCATGGATCTCAAA	ATGAAATGGCAAATCGGCTGACGG
IFNγ	GCCCTCTCTGGCTGTTACTG	CCAAGAGGAGGCTCTTTCCT
IL4	ACGTGATGTACCTCCGTGCTTGAA	TCAGTGTGTGAGCGTGGACTCAT
IL6	AAGCTGAGCGACGAGTACAAGA	GTCAGCTCCAGCACCTTGTTG
IL10	ATAACTGCACCACTTCCAGTCA	ACAAGGCTTGGCAACCAAGTAAC
TGFβ	CCATGACATGAACCGACCCT	CCGGGTTGTGTTGGTTGTAG
Fractalquina	TGGACCCATTTCTCCTTTGGGTCA	AATCCCAGTGACCTTGCTCATCCA
FOLR2	AGAGACATGGCCTGGAAACAGACA	TGGACTACACTGGTCATGCAGCTT
ArgI	AAGAAAAGGCCCATTCACCT	TTCCCAAGAGTTGGGTTTAC
PI3K	GGTACAAGTCCCTTCAGCCC	GGTCAGCCCCATCTTCAGTC
AKT	CCAAGGAGATCATGCAGCAC	TTCACTGTCCACACACTCCAT
KEAP1	AGAGACCTGGACTTTTCGTAGC	GGGTCACTTCACTCCAGGTA
NRF2	TTTGTAGATGACCATGAGTCGC	GCCAACTTGCTCCATGTCC
HO1	TTCAGAAGGGTCAGGTGTCC	AAGGCCATGTCCTGCTCTAG
NQO1	GCTTGCTTTTCACTTTTCGCC	GAGGCCCTAATCTGACCTC
SOD1	AGGGCGTCATTCACTTCGAG	CCTCTCTTCATCCGCTGGAC
CAT	CACCTGAAGGACCCTGACAT	CCATTGCGATTAAACAGCTT
GPx	TGAGAAGTGCAGGTGAATG	CGGGGACCAAATGATGTACT
Tubulina	CCCTCGCCATGGTAAATACAT	ACTGGATGGTACGCTTGGTCT
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<b>RATÓN</b>		
TLR3	AGCTTTGCTGGGAACCTTCA	GAAAGATCGAGCTGGGTGAG
TRIF	CCACGTCCTACACGGAAGAT	TCCACGACATAGGGGACAAT
IRF3	ACGTGTCAACCTGGAAGAGG	GGCACCAGATGTACGAAGT
IkBα	TGAGGATGAGGAGAGCTATGACA	CCTCCAAACACACAGTCATCGT
NFκB	GCGTACACATTCTGGGGAGT	GTTAATGCTCCTGCGAAAGC



<b>COX-2</b>	ACTGGGCCATGGAGTGGACTTAAA	AACTGCAGGTTCTCAGGGATGTGA
<b>mPGES1</b>	CCTAGGCTTCAGCCTCACAC	CAGCCTAATGTTTCAGCGACA
<b>iNOS</b>	CTGCTGGTGGTGACAAGCACATTT	ATGTCATGAGCAAAGGCGCAGAAC
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	ACATAAAGTCCTTCCCGCTGACCA	AAATTCGGATGGCCACCTCTTTGC
<b>L-PGDS</b>	CATGACACAGTGCAGCCCACTTT	TTTCTTCTCCCGGAACCAGCTTGA
<b>CB1</b>	AACTGTGCCAGGCAATCTGTTGTG	GGCCTTCCCATTGAAGCACAAACT
<b>CB2</b>	TGAAGATCGGCAGTGTGACCATGA	AATGCTGAGAGGACCCACATGACA
<b>NAPE</b>	TGCTGTCTCATCAGTCACAACCA	GTTCTCGCAGCCACATTTCTGCAT
<b>DAGL<math>\alpha</math></b>	GCCTGGCCATCTTGGTGATT	TCTTGGTGGCTCTCAGCTTG
<b>FAAH</b>	TGGAGTCGACTTAAACGCTGCTGA	TCTGGCAAACAGTAGGCACTCGAT
<b>MAGL</b>	CAGAGAGGCCAACCTACTTTTC	ATGCGCCCCAAGGTCATATTT
<b>IL1<math>\beta</math></b>	TGGAGAGTGTGGATCCCAAGCAAT	TGCTTGTGAGGTGCTGATGTACCA
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	TTCCGAATTCAGTGGAGCCTCGAA	TGCACCTCAGGGAAGAATCTGGAA
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	AGTGAGCTGACCCAGCAGAT	GGTGGAGGTCATTGCAGAAT
<b>IFN <math>\beta</math></b>	CCCTATGGAGATGACGGAGA	ACCCAGTGCTGGAGAAATTG
<b>STAT1</b>	GTGGTTCACCATTTGTTGCAG	AATGAGCTGCTGGAAGAGGA
<b>IL6</b>	TGGCTAAGGACCAAGACCATCCAA	AACGCACTAGGTTTGCCGAGTAGA
<b>IL10</b>	GTAGAAGTGATGCCCCAGGC	GAGAAATCGATGACAGCGCC
<b>TGF<math>\beta</math></b>	GGACTCTCCACCTGCAAGAC	GACTGGCGAGCCTTAGTTTG
<b>Fractalquina</b>	CTCACGAATCCCAGTGGCTT	TTTCTCCTTCGGGTCAGCAC
<b>FOLR2</b>	AAGGCTGACTCCCGTCTGTA	GCTCTTTACGCCAACTCTGG
<b>Argl</b>	AAAGCTGGTCTGCTGGAAAA	ACAGACCGTGGGTTCTTCAC
<b>PI3K</b>	AGTGTGTGGCTGTGACGAAT	CGGCAGCTGAGAGTATAGGC
<b>AKT</b>	CGGTTCTTTGCCAACATCGT	CTCACTGTCCACACACTCCAT
<b>KEAP1</b>	CTCAACCGCTTGCTGTATGC	CTCTGTCTCCACGTCGTAGC
<b>NRF2</b>	GGACATGGAGCAAGTTTGGC	CCAGCGAGGAGATCGATGAG
<b>HO1</b>	CTGCAGGTGATGCTGACAGA	TGGGGGCCAGTATTGCATTT
<b>NQO1</b>	CGCTGAGCCCAGATATTGT	TCCTGCTACGAGCACTCTCT
<b>SOD1</b>	GGAAGCATGGCGATGAAAGC	CCCATACTGATGGACGTGG
<b>CAT</b>	CACTGACGAGATGGCACACT	TGTGGAGAATCGAACGGCAA
<b>GPx</b>	TGCAATCAGTTCGGACACCA	AAGGTAAAGAGCGGGTGAGC

**Tabla 3.** Lista de los partidores utilizados según el gen estudiado.

#### 4.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINA A EN COLON POR ELISA.

La principal función de la inmunoglobulina A (IgA) es la inmunoprotección de las mucosas. Los homogenizados de colon utilizados en WB, también se usaron para cuantificar los niveles de IgA, empleando el kit comercial *Rat IgA ELISA Kit* (ref. E111-102, Bethyl Laboratories®, EEUU). Es un ELISA de tipo sándwich, en donde la placa tiene adherida en el fondo de los pocillos anticuerpos específicos para la detección de IgA de rata, el cual capturará la IgA presente en la muestra. Posteriormente, un anticuerpo secundario biotinilado se unirá a las IgAs capturadas, formando un complejo que en presencia de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa catalizarán una reacción colorimétrica sobre el substrato cromogénico. La reacción se cuantifica por espectrofotometría a 450nm (Synergy 2, BioTek, Alemania), y la absorbancia es

proporcional a la cantidad de IgA presente en la muestra. El nivel de detección mínimo del kit es de 1.37 ng/ml.

#### 4.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LPS.

El lipopolisacárido (LPS) es un componente fundamental de la pared de las bacterias Gram negativas, dicho componente se cuantificó en el plasma como índice de presencia de componentes bacterianos en el organismo. Para ello se utilizó un kit comercial *LAL Chromogenic endpoint assay* (ref. HIT302, Hycult Biotechnology, EEUU), el cual se basa en la capacidad del LPS de causar una coagulación intravascular en los cangrejos herradura (*Limulus polyphemus*). Dicho kit utiliza un lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL), el cual en presencia del LPS desencadena una reacción enzimática que conlleva a la opacidad y gelidificación de la mezcla. En presencia de un sustrato incoloro, la reacción enzimática genera una coloración amarilla que se mide por a 405nm (Synergy 2, BioTek, Alemania). Siguiendo las especificaciones del protocolo del kit, las cantidades de LPS (en unidades de endotoxina por ml, EU/ml). El nivel de detección mínimo del kit es de 0.04 EU/ml.

#### 4.8 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS POR ELISA.

Se usaron los homogenizados totales de PFC para la medición de los niveles de algunas citoquinas mediante ELISA, técnica basada en el reconocimiento mediante la unión específica antígeno-anticuerpo. Los resultados se normalizaron con la concentración proteica presente en cada muestra.

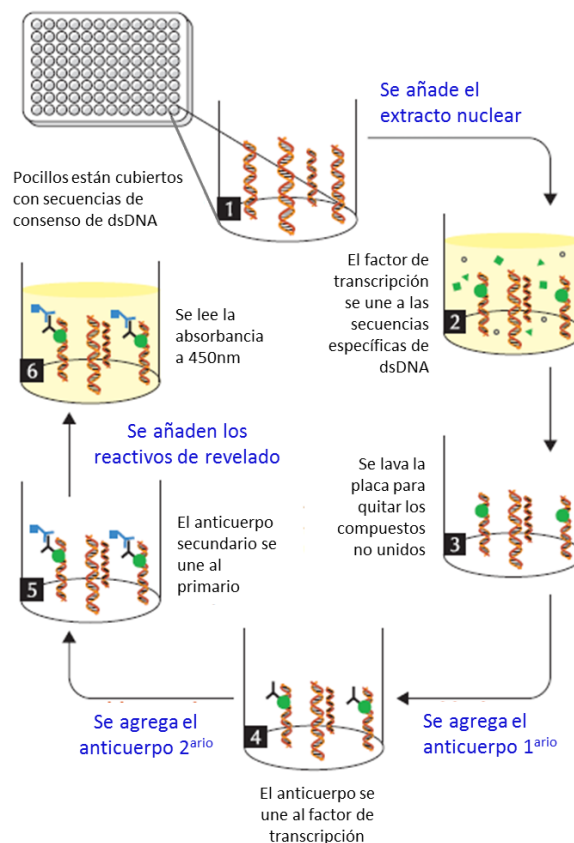
- *Rat TNF $\alpha$  ELISA Kit* (ref. ELR-TNFalpha-001C, RayBiotech®, EEUU); tiene un límite de detección de 25pg/ml. La curva estándar proporcionada en el kit tiene un rango de 0 a 20000pg/ml.

- *Rat IL1 $\beta$  ELISA Kit* (ref. ELR-IL1beta-001C, RayBiotech®, EEUU); tiene un límite de detección de 80pg/ml. La curva estándar proporcionada en el kit tiene un rango de 0 a 50000pg/ml.

- *Rat IL10 ELISA Kit* (ref. ELR-IL10-001C, RayBiotech®, EEUU); presenta un límite de detección de 10pg/ml. La curva estándar proporcionada en el kit tiene un rango de 0 a 6000pg/ml.

#### 4.9 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

La actividad de los factores de transcripción estudiados en esta tesis, NFκB, PPARγ y NRF2 se realizó en los extractos nucleares de PFC mediante la utilización de los kits comerciales *NFκB (p65) Transcription Factor assay kit* (Ref. 10007889, Cayman Europe, Estonia), *PPARγ Transcription Factor Assay Kit* (Ref. 10006855, Cayman Europe, Estonia) y *NRF2 Transcription Factor Assay Kit* (Ref. 600590, Cayman Europe, Estonia). Es un ELISA, en donde se detecta la capacidad de unión de los factores de transcripción presentes en la muestra a las secuencias de consenso de DNA que se encuentran en el fondo de los pocillos de la placa de cada kit (Fig. 24). Dicha actividad se midió a 450nm (Synergy 2, BioTek, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores obtenidos se normalizaron con la concentración proteica presente en cada extracto.



**Figura 24.** Esquema metodológico de los kits de actividad transcripcional de NFκB y PPARγ. (Adaptado del manual del kit); dsDNA, DNA doble hebra.

#### 4.10 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PROSTAGLANDINAS EN CORTEZA PREFRONTAL.

**a) Preparación de la muestra:** Uno de los segmentos de PFC fue homogenizado por sonicación en 400µl de tampón fosfato 0,1M pH7.4, suplementado con EDTA 1mM e indometacina 10µM. Al homogenizado se le añade 1ml de etanol absoluto (Merk, GB), se agitan y se dejan reposar por 15 minutos a 4°C. Luego se centrifugan a 3000g durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante, el cual se acidifica con 10µl de ácido acético glacial (Sigma, España). Nuevamente se dejan reposar por 15 minutos a 4°C y se centrifuga a 500g durante 2 minutos, se extrae el sobrenadante y se añade a la columna de C18 previamente activada.

La activación de las columnas C18 (C18 Sep-Pak®, Waters Corp., EEUU) se realiza agregando 3ml de metanol, seguidos de 3 ml de agua milli-Q. Una vez activadas y lavadas las columnas se agrega la muestra y se deja filtrar por gravedad, una vez que toda la muestra ha pasado por la columna, se lava la columna con 3ml de agua milli-Q y luego con 3ml de hexano (Sigma, España). Finalmente, el contenido de prostaglandinas unidas a la fase sólida de la columna se eluyeron con 1ml de acetato de etilo (Sigma, España). Las muestras purificadas se almacenaron a -80°C hasta el día siguiente, donde se procedió a evaporar el disolvente bajo un flujo continuo de nitrógeno a temperatura ambiente. El contenido restante se resuspendió con 250µl del tampón comercial proporcionado por el kit.

**b) Cuantificación de los niveles de PGE<sub>2</sub>:** Para la medición de los niveles de PGE<sub>2</sub> en la corteza prefrontal, se utilizó un kit comercial de inmunoensayo enzimático competitivo "*Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA Kit*" (Ref. 514010, Cayman Europe, Estonia). El fundamento del kit se basa en la competición entre la PGE<sub>2</sub> (presente en la muestra) y el conjugado PGE<sub>2</sub>-acetilcolinesterasa (proporcionado por el kit) por la unión a los anticuerpos anti-PGE<sub>2</sub> presentes en el fondo de los pocillos. Como la concentración del conjugado es constante, la variabilidad de la unión está dada por la cantidad de PGE<sub>2</sub> presente en la muestra, cuya cantidad será inversamente proporcional a la del conjugado unido a los anticuerpos. Posteriormente la placa se lava y se incuba con el reactivo de Ellmans, el cual contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa, generándose un producto de color amarillo que puede medirse por espectrofotometría a 412nm

(Synergy 2, BioTek, Alemania). El límite de detección del ensayo es de 15pg/ml (80% B/B<sub>0</sub>).

**c) Cuantificación de los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub>:** Para medir los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> en PFC, se usó un kit de ELISA comercial (15-deox- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> ELISA, DRG®, Alemania). Al igual que el kit de la PGE<sub>2</sub> es un inmunoensayo competitivo, en donde la 15d-PGJ<sub>2</sub> presente en la muestra compite frente a la molécula alcalina que tiene adherida 15d-PGJ<sub>2</sub> (proporcionado en el kit) por la unión al anticuerpo presente en los pocillos de la placa. Posteriormente se añade el substrato, el cual desencadena una reacción enzimática que genera un producto amarillo medible a 405nm (Synergy 2, BioTek, Alemania). La sensibilidad del ensayo es de 36pg/ml.

#### **4.11 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CORTEZA PREFRONTAL Y PLASMA.**

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación se refiere a una degradación oxidativa de los lípidos, es un mecanismo de daño celular usado como indicador del estrés oxidativo presente en los tejidos y las células. El malondialdehído (MDA) es un producto natural de la peroxidación lipídica, resultante de la acción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno sobre las membranas celulares.

Una manera de evaluar los niveles de peroxidación lipídica es mediante el test del ácido tiobarbitúrico para MDA (*Das y Ratty, 1987*), también conocido como TBARS. Para ello, las muestras de corteza cerebral se homogenizaron por sonicación en 550μl de tampón fosfato 0,05M. Las muestras fueron desproteinizadas con ácido tricloroacético (TCA) y ácido clorhídrico (HCl). Posteriormente, se añadió ácido tiobarbitúrico (TBA) al 2% p/v en NaOH 0,5N. La mezcla se dejó reaccionar bajo altas temperaturas (90-95°C) durante 15 minutos para facilitar la formación del complejo MDA-TBA, el cual es colorimétricamente medible. Las muestras se centrifugaron a 12000g durante 15 minutos a 4°C para detener la reacción y recoger el sobrenadante rosa, el cual se midió por espectrofotometría a 532nm (Synergy 2, BioTek, Alemania). Los niveles de MDA obtenidos en las muestras fueron normalizados con la concentración proteica de cada una de ellas.

Para la medición de los niveles de MDA en plasma se utilizó un kit comercial “TBARS Assay Kit” (Ref. 10009055, Cayman Europe, Estonia), el cual también basa en la formación del complejo MDA-TBA medible a 530nm bajo condiciones ácidas y a altas temperaturas.

#### **4.12 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE NITRITOS EN CORTEZA PREFRONTAL Y PLASMA.**

La medición de los niveles de nitritos se utiliza como extrapolación de la actividad de la óxido nítrico sintasa presente en el cerebro (*Salter et al., 1996*). La metodología se basa en la reacción de Griess (*Green et al., 1982*). Es una reacción de diazotación, en el cual se emplean dos aminas, el ácido sulfanílico y  $\alpha$ -naftilamina. En una primera fase se diazota el ácido sulfanílico, formándose un catión de diazonio que se une con  $\alpha$ -naftilamina, dando a lugar un colorante azoico rosa.

Para éstas determinaciones se utilizaron los sobrenadantes de los homogenizados usados en la medición de los niveles de MDA. En una placa de 96 pocillos se añade por duplicado 100 $\mu$ l de muestra (sobrenadante o plasma) o estándar, luego se agregan 100 $\mu$ l del reactivo de Griess (formado por 50 $\mu$ l de N-1-(Naftil) etilenediamina (Neda) al 0,1% y 50 $\mu$ l de sulfanilamida al 1%). El producto formado se mide a 540nm (Synergy 2, BioTek, Alemania). Los niveles de nitritos obtenidos se normalizan respecto a la concentración proteica existente en la muestra, y se extrapolan en una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrato de sodio.

#### **4.13 INMUNOFLUORESCENCIA**

Para el estudio de la expresión y localización de los marcadores de microglía de fenotipo antiinflamatorio (“M2”) se realizó una inmunofluorescencia doble.

Las secciones almacenadas a -40°C fueron lavadas con KPBS y se sometieron al proceso de recuperación antigénica con un tampón citrato de sodio pH 6.0 durante 15 minutos a 62°C, posteriormente los cortes se incuban con cloruro de amonio 50mM durante 15 minutos para quitar la autofluorescencia presente en el tejido.

El bloqueo se realizó en suero de burro (Normal Donkey Serum, abcam) al 10% en KPBS con tritón al 0.3% durante una hora a temperatura ambiente. La dilución de los anticuerpos primarios se realizó en la misma solución de bloqueo. Se utilizaron los mismos anticuerpos usados en WB (rabbit anti-FOLR2, ab103998; rabbit anti-Argl, ab91279), y ambos se incubaron en una dilución 1:300 durante 48 horas a 4°C en agitación. Como marcador celular de microglía se utilizó la molécula adaptadora de unión a calcio o Iba1 (goat anti-Iba1, ab5076, dilución 1:750). Además, se utilizó como marcador de neurona NeuN (mouse anti-NeuN, ab104224, dilución 1:1000)

Después de lavar los cortes, éstos se incubaron con los anticuerpos secundarios *donkey anti-rabbit* conjugado con Alexa 555 (Life Technologies), *donkey anti-goat* conjugado con Alexa 488 (Life Technologies) y *donkey anti-mouse* conjugado con Alexa 488 (Life Technologies) durante 90 minutos a temperatura ambiente en la solución de bloqueo antes mencionada. Posteriormente las secciones se lavaron durante 30 minutos en KPBS y se montaron en portaobjetos Superfrost plus® (Thermoscientific), se dejaron secar y se usó como medio de montaje Prolong® Gold antifade reagent con DAPI (Life Technologies®).

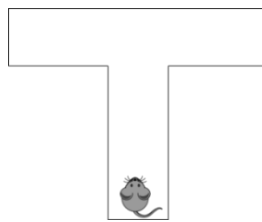
A su vez se realizaron controles incubando secciones con cada uno de los anticuerpos primarios por separado y luego con ambos anticuerpos secundarios para comprobar que no existan reacciones cruzadas entre los anticuerpos. También se realizaron controles de interferencia de canales, incubando cada uno de los anticuerpos primarios con su correspondiente secundario por separado y recogiendo imágenes en todos los canales. De igual manera se realizó un control de autofluorescencia siguiendo el mismo protocolo pero sin agregar los anticuerpos primarios ni los secundarios.

Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Eclipse Ti-S (Nikon, Holanda) asociado al software NIS-Elements v3.2.

#### 4.14 TEST COMPORTAMENTAL

Para la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en los ratones del modelo animal de esquizofrenia (expuestos a infección prenatal) se realizó el test de T-

*Maze* (Sharma et al., 2010). Dicho test consiste en un laberinto en forma de T, en donde el animal se sitúa en la base de la T y se les permite elegir uno de los brazos del laberinto (Fig.25). En los ensayos sucesivos, el animal tiende a elegir el brazo no visitado anteriormente, lo cual se conoce como “alternación espontánea” (Dember y Richman, 1989), un reflejo de la memoria de trabajo. Tanto la alternación espontánea como el mecanismo de recompensa son sensibles al deterioro de estructuras cerebrales como el hipocampo (Deacon et al., 2002). Por otro lado, lesiones en la corteza prefrontal producen desórdenes en el procesamiento y la orientación espacial (Deacon y Rawlins, 2003).



**Figura 25.** Esquema representativo de T-Maze, visto desde arriba. El roedor se ubica en la base del laberinto al iniciar el test.

**a) Fase de habituación:** En esta fase los animales son sometidos a una sesión de aclimatación al entorno durante cinco días consecutivos. Durante el primer día se colocan dos animales a la vez en el laberinto, en el cual se había puesto comida por todo el campo previamente y se les deja recorrer el laberinto libremente durante 3 minutos, se realizan tres rondas. En el segundo y tercer día se repite el proceso, pero la comida sólo está presente en los extremos de los brazos del laberinto, se hacen tres rondas de 90 segundos. En el cuarto y quinto día se repite el proceso, pero usando sólo un animal a la vez.

**b) Fase de entrenamiento:** Durante ésta fase los animales son sometidos a una restricción calórica, recibiendo 3 gr de comida al día. Durante los cinco días de entrenamiento los animales fueron sometidos individualmente a seis rondas de entrenamiento por día. Cada ronda consta de dos partes, se somete al animal a una carrera forzada donde se deja abierto el brazo izquierdo del laberinto y se cierra el derecho, en el extremo del brazo se deja un pellet de comida a modo de estímulo. Se quita el animal del laberinto y se le deja reposar por 10 segundos. Posteriormente se somete al animal a una carrera libre, en donde ambos brazos están abiertos. El animal



recibirá el premio (comida) sólo si recuerda en que brazo se encontraba, en este caso el de la carrera forzada. El brazo usado en la carrera forzada se va alternando entre las dos posibilidades disponibles. Finalmente, cuando los animales del grupo control alcanzan un porcentaje de aciertos superior al 70% durante dos días consecutivos, se procede a realizar el test.

**c) Test:** El procedimiento es el mismo que en los días de entrenamiento. Se realizan tres rondas donde el tiempo de reposo es de 10 segundos, y tres rondas donde el tiempo entre carreras es de 40 segundos.

Los test de comportamiento se realizaron en el laboratorio del Dr. Meana, en el Dpto. de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada muestra se analizó por duplicado o triplicado y los resultados obtenidos han sido expresados como la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media). El programa estadístico utilizado en los estudios en modelos animales fue el GraphPad Prism®

En los estudios de animales donde los grupos experimentales eran más de dos, se realizó un análisis de varianza o *ANOVA de una vía*, seguido del post test de comparación múltiple *Newman-Keuls*, se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

En el caso de los estudios en modelos animales de estrés y de infección prenatal se utilizó un *ANOVA de dos vías*, con un  $p < 0.05$ ; el primer factor considerado fue la presencia o ausencia de estrés/infección prenatal según corresponda, y el segundo factor fue la presencia o ausencia del tratamiento farmacológico. A su vez, se realizó el post test de *Bonferroni* con un  $p < 0.05$ , para determinar entre qué grupos se daban las diferencias. Además, cuando la interacción de ambas condiciones era significativa se procedió a realizar un *ANOVA de una vía* con post test de *Newman-Keuls*.

En el estudio de pacientes con un primer episodio psicótico, las diferencias observadas en la condición basal entre los controles y los pacientes, fueron evaluadas realizando un  $\chi^2$  (chi-cuadrado) o el test no paramétrico U de Mann-Whitney según la distribución y las escalas de las variables. Para la evaluación del tratamiento farmacológico se calcularon los equivalentes del antipsicótico en relación a la

clorpromazina (*Gardner et al., 2010*) y se realizaron modelos de regresión lineal para cada marcador biológico estudiado. Para estudiar la asociación entre el tratamiento de RSP/PALI y los niveles de los marcadores biológicos se usaron modelos de regresión logística, en donde se tuvieron en cuenta factores confusores como edad, género, BMI, uso de cannabis por mes y niveles de cotinina (uso de tabaco). Para el estudio de los marcadores biológicos en los pacientes tratados con RSP se realizó un t-test con post-test de Wilcoxon. Las bases de datos fueron gestionadas y analizadas con el programa IBM SPSS Statistics v.20®.



LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

expide a

**D<sup>a</sup>.KARINA MAC-DOWELL MATA**

el presente

**CERTIFICADO DE FORMACIÓN CONTINUA**

por haber superado satisfactoriamente el curso:

**“ACREDITACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES  
EN EXPERIMENTACIÓN: CATEGORÍA B”**

referenciado como Curso Certificado de Formación Continua, celebrado en  
Madrid, del 26 al 30 de abril de 2010

**Manuel Rodríguez Sánchez**  
Vicerrector de Doctorado y  
Titulaciones Propias



SANTIAGO OSPITALEA  
HOSPITAL SANTIAGO

1º. Que este Comité evaluado la propuesta

**Informe del Comité Ético de Investigación Clínica  
Hospital Santiago**

Título: Interacción genotipo

Investigador: Antor  
Versión Protocolo: 1  
Versión Hoja Infor

D. Guillermo Alca  
Clínica del Hospita



Que este Comité longitudinal en neurotróficos y fu 2008, según const realización de dich del Hospital Santis

2º. Considera que  
Se respetan los informad.  
Se realiza de conl

3º. Por lo que este i

D. Ramon Gomis de Barbarà, Director de Investigación del Hospital

CERTIF

Que el i  
celebra  
titulado  
Interac  
predicti



**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

cuyo in  
del Ser D. Jesús Almedirál Garrote, Presidente del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA - ÁREA I  
entend  
investi  
los req Que ha evaluado la propuesta del  
sus tér

su apr CÓDIGO: P1081203  
TÍTULO: "Interacción genotipo psicóticos"  
Lo que PROMOTOR: Investigador

considera que:

- El estudio se plantea sigi
- Se cumplen los requisitos
- El alcance de las compen
- La capacidad del investig
- Además, el citado CEIC:

Este CEIC acepta que dicho estu

Dra. María José Parellada Redon

Teléfono / Teléfono: 945 00  
Fax-a / Fax: 945 00 79 01  
Pósta / Apdo. Correos nº 1  
01080 VITORIA-GASTEIZ

SECRET

CF-6-043123



SERVICIO DE SALUD  
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS  
Comité Ético de Investigación Clínica  
Regional del Principado de Asturias  
C/ Celestino Villamil s/n  
33006 Oviedo  
Tfno. 985 10 79 27  
Fax. 985 10 87 11  
e-mail: pscic.asturias@hca.es

El Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias, reunido el día 22-04-2008, acta 04/08, ha revisado el Proyecto de investigación Proyecto nº 19/08, titulado: INTERACCION GENOTIPO-FENOTIPO Y AMBIENTE. APLICACIÓN A UN MODELO PREDICTIVO EN PRIMEROS EPISODIOS PSICÓTICOS, investigador principal Dr. Manuel Boussoño García del Servicio de Psiquiatría de la Universidad de Oviedo.

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado proyecto reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y en consecuencia emite su autorización.

Le recuerdo que deberá guardarse la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este proyecto.

En Oviedo a veintidós de abril de dos mil ocho.

Fdo. Eduardo Amador Moral  
Secretario del Comité Ético de Investigación  
Clínica Regional del Principado de Asturias





## V. Resultados

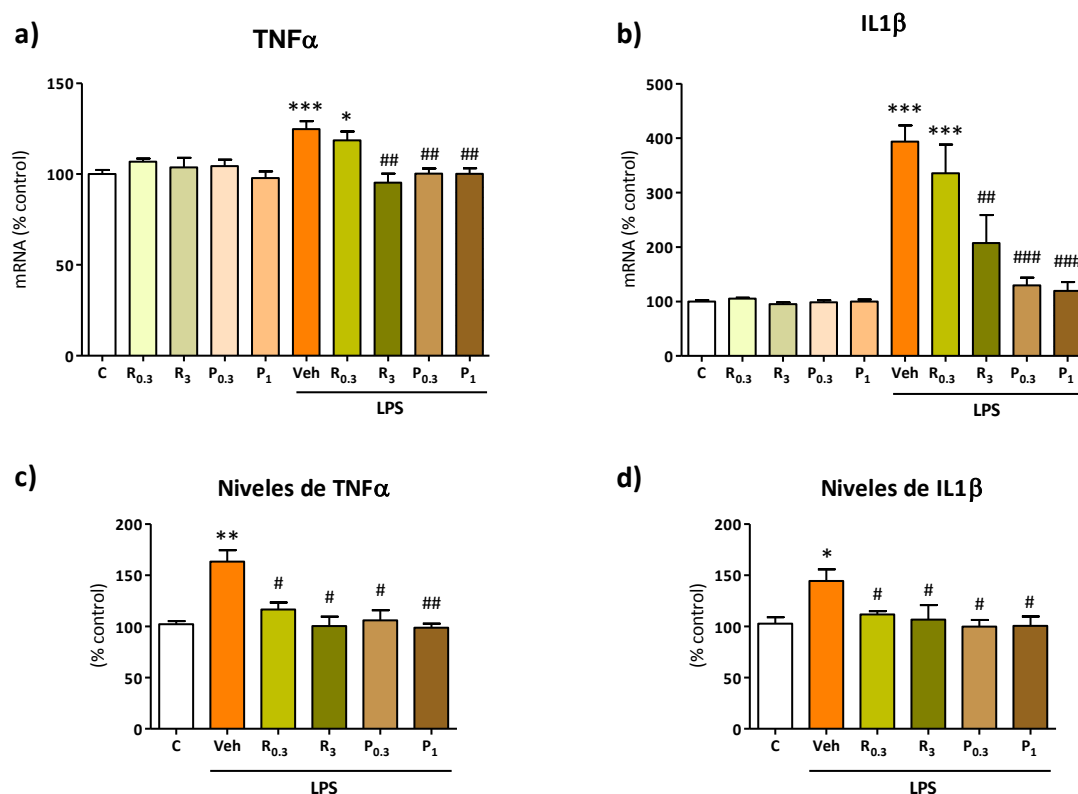
- 1. MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDO POR LPS**
- 2. MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDO POR ESTRÉS**
- 3. MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUCIDO POR INFECCIÓN MATERNA**
- 4. ESTUDIO EN PACIENTES CON UN PRIMER EPISODIO DE PSICOSIS**

## 1. NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS.

Nuestro primer objetivo fue evaluar los posibles efectos en el balance inflamatorio del antipsicótico atípico Risperidona (RSP) y de su metabolito activo Paliperidona (PALI). Para ello, se realizó un modelo animal de neuroinflamación inducido por LPS. En dicho modelo se aprecia un aumento de diversos parámetros proinflamatorios y una disminución de los antiinflamatorios. Los animales fueron tratados previamente con los antipsicóticos RSP (0.3 y 3 mg/kg i.p), PALI (0.3 y 1 mg/kg i.p) o vehículo; 30 minutos después fueron expuestos al estímulo inflamatorio (LPS). Los efectos del tratamiento se evaluaron tanto a nivel de la corteza prefrontal (PFC) como a nivel periférico en PBMC o plasma.

### 1.1 EFECTO DE RISPERIDONA/PALIPERIDONA EN LOS NIVELES DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS INDUCIDAS POR LPS EN CORTEZA PREFRONTAL.

La administración de LPS induce un aumento en los niveles de mRNA y proteína de las citoquinas proinflamatorias, IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , cuando se compara con respecto a los niveles del grupo control (Fig.26). Sólo la dosis mayor de RSP y ambas dosis de PALI usadas, previenen el aumento de los niveles de mRNA de las citoquinas inducidos por el LPS (Fig.26a, b). Por otro lado, tanto las dosis de RSP como de PALI disminuyen los niveles de ambas citoquinas inducidos por el LPS en la corteza prefrontal (Fig.26c, d).

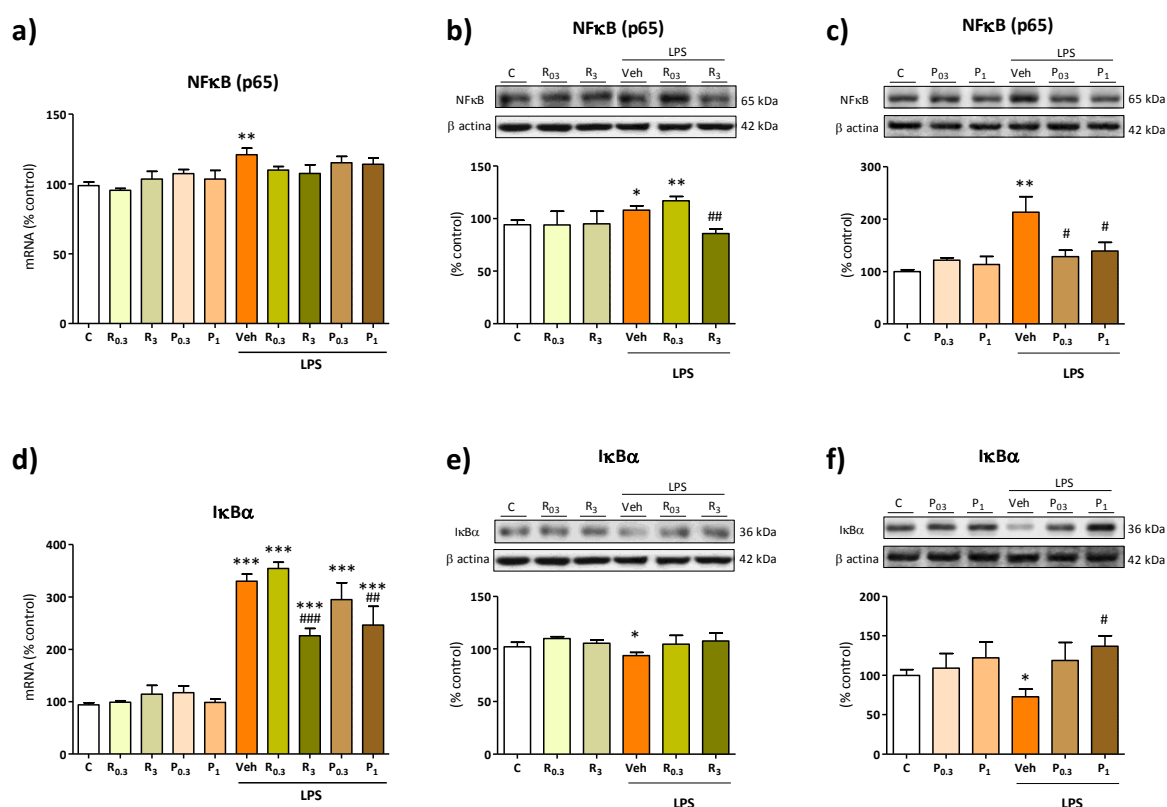


**Figura 26. Efecto de RSP/PALI en los niveles de las citoquinas IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  inducidos por LPS.** Niveles de mRNA de TNF $\alpha$  (a) e IL1 $\beta$  (b) y niveles de TNF $\alpha$  (c) e IL1 $\beta$  (d) en corteza prefrontal de ratas control (C, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>) y expuestas a LPS (Veh, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-8). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+LPS. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls.

## 1.2 EFECTO DE RISPERIDONA/PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL NFκB INDUCIDA POR LPS EN CORTEZA PREFRONTAL.

El aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias TNFα e IL1β, promueve la traslocación del factor de transcripción nuclear NFκB desde el citosol al núcleo, mediante la fosforilación y degradación de su proteína inhibitoria IκBα. La exposición a LPS aumenta los niveles de mRNA de la subunidad p65 de NFκB respecto al grupo control (Fig.27a), dicho efecto se reproduce en los niveles proteicos de los extractos nucleares de PFC (Fig.27b, c). El incremento de los niveles de p65 inducido por LPS fue inhibido por la dosis mayor de RSP y por ambas dosis de PALI (Fig.27b, c).

Por otro lado, se estudiaron los niveles del mensajero de IκBα (Fig.27d). Todos los grupos expuestos a LPS presentaron un aumento en los niveles de mRNA respecto al grupo control, y aquellos pre-tratados con las dosis mayores de antipsicóticos presentaron un efecto preventivo frente al LPS (Fig.27d). A pesar del aumento de los niveles de mRNA de IκBα en el modelo inflamatorio, los niveles de la proteína están disminuidos (Fig. 27e, f), dicho efecto es contrarrestado por el tratamiento con PALI (1mg/kg) (Fig.27f).



**Figura 27. Efecto de RSP/PALI en la activación de la vía del NFκB inducida por LPS.** Niveles de mRNA (a) y proteicos de NFκB (b, c) y niveles de mRNA (d) y proteicos de IκBα (e,f) en corteza prefrontal de ratas control (C, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>) y expuestas a LPS (Veh, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=6-8). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+LPS. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls.

### 1.3 EFECTO DE RISPERIDONA/PALIPERIDONA EN LOS MARCADORES OXIDATIVOS/NITROSATIVOS INDUCIDOS POR LPS EN CORTEZA PREFRONTAL.

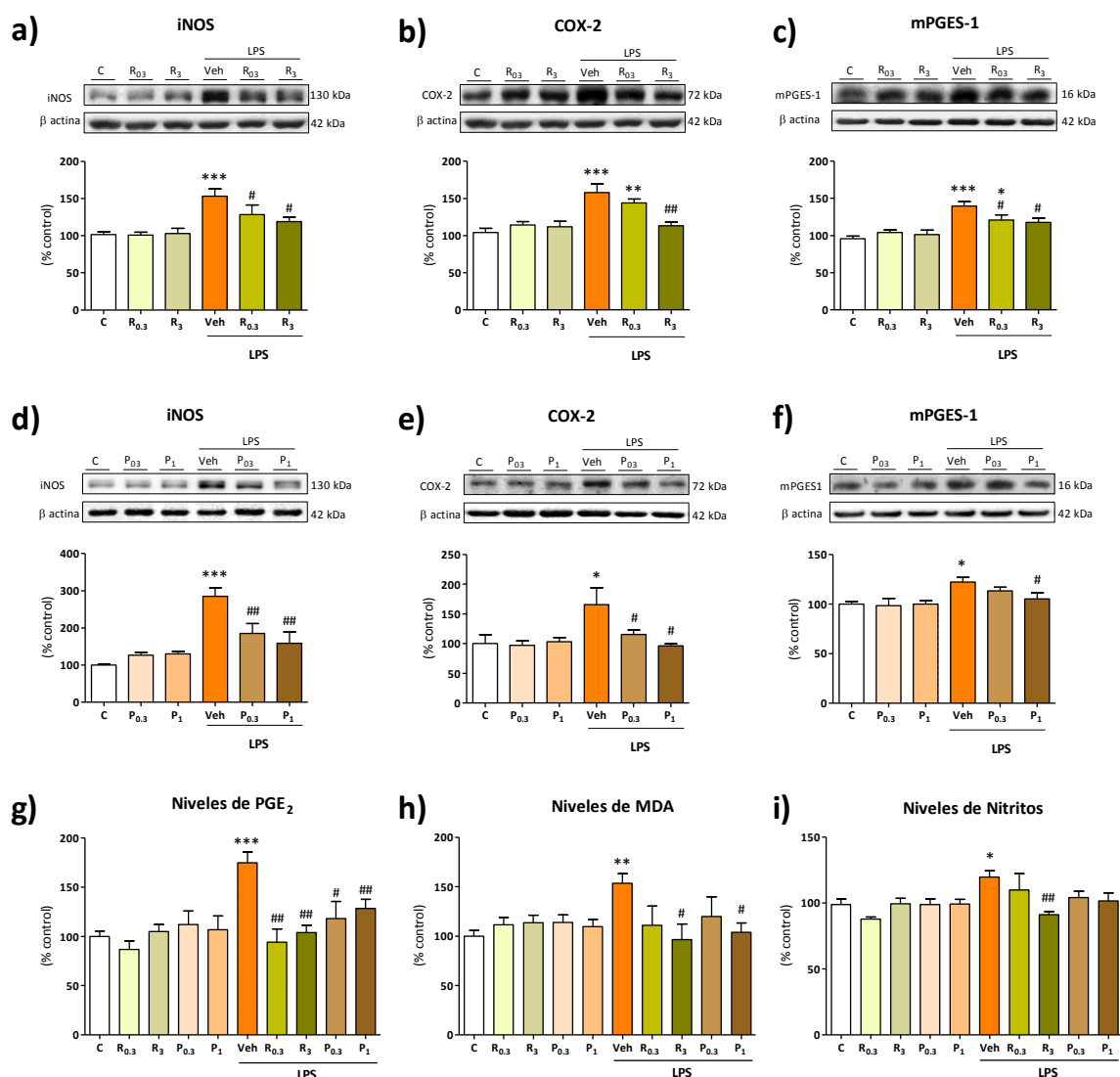
La activación de NFκB induce un aumento en la transcripción de secuencias específicas del DNA, entre ellas se induce las de las enzimas proinflamatorias iNOS y COX-2. Principales fuentes enzimáticas implicadas en la acumulación de mediadores oxido/nitrosativos e inflamatorios derivados de la exposición a LPS.

El LPS induce un aumento en los niveles proteicos de las enzimas iNOS, COX-2 y mPGES-1 respecto al grupo control (Fig.28a-f). La enzima mPGES-1 es la responsable de la síntesis de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub>, cuyos niveles también aumentan frente a la exposición a LPS con respecto al grupo control (Fig.28g). La consecuencia del aumento en dichos mediadores inflamatorios, se puede observar en los marcadores de daño nitrosativo, como los niveles de peroxidación lipídica (MDA) y nitritos, los cuales también se incrementan frente a la exposición a LPS (Fig.28h, i).

Tanto los tratamientos con RSP como con PALI previenen el incremento de los niveles de iNOS inducidos por LPS (Fig.28a, d). Respecto a COX-2, ambos tratamientos con PALI inhiben el incremento inducido por el LPS (Fig. 28e), pero solo la dosis mayor de RSP puede reproducir el mismo efecto (Fig.28b). Por otro lado, RSP es capaz de prevenir el aumento de mPGES-1 inducido por el LPS mediante ambas dosis (Fig.28c), en cambio PALI solo lo consigue con su dosis mayor (Fig.28f). Finalmente, las dosis de ambos antipsicóticos previenen el aumento de los niveles de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub> inducidos por LPS (Fig.28g). De igual manera, solo las dosis mayores de los antipsicóticos previenen el aumento de los niveles de peroxidación lipídica (Fig.28h) y solo la dosis mayor de RSP previene el aumento de los niveles de nitritos inducidos por LPS (Fig.28i).

Estos resultados han sido ratificados mediante la medición de los niveles de mRNA de cada una de las enzimas estudiadas. LPS induce un aumento en los niveles de mRNA de iNOS, COX-2 y mPGES-1. Los tratamientos de RSP previenen el aumento de los niveles de mRNA de iNOS y COX-2, y sólo la dosis de 3mg/kg previene el aumento del mRNA de mPGES-1. Respecto a los tratamientos con PALI, éstos previenen el aumento de los niveles de mRNA de COX-2, pero no los de iNOS y mPGES-1 (Tabla Resumen 1)



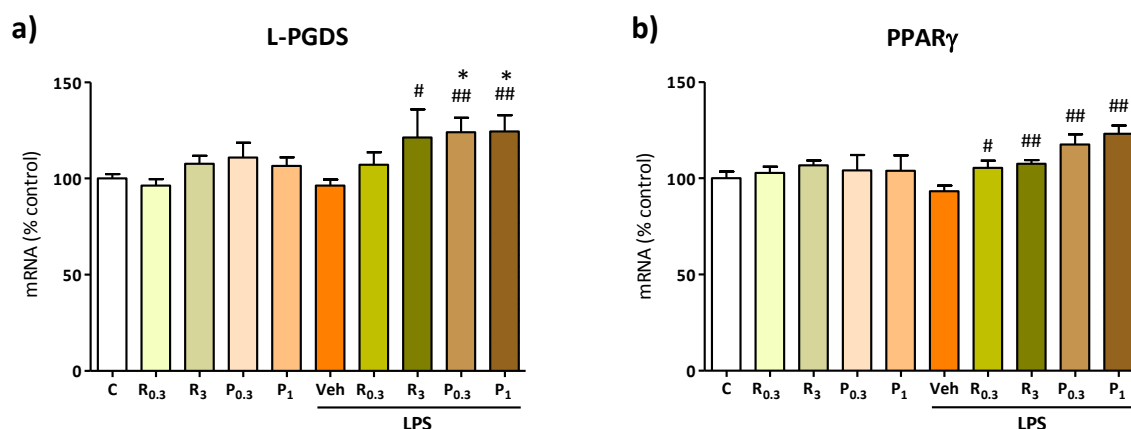


**Figura 28. Efecto de RSP/PALI en los mediadores oxidativos/nitrosativos inducidos por LPS.** Niveles proteicos de iNOS, COX-2 y mPGES-1 (a-f), niveles de PGE<sub>2</sub> (g), MDA (h) y Nitritos (i) en corteza prefrontal de ratas control (C, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>) y expuestas a LPS (Veh, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-8). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+LPS. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls.

#### 1.4 EFECTO DE RISPERIDONA/PALIPERIDONA EN LOS MARCADORES DEL BALANCE ANTIINFLAMATORIO INDUCIDOS POR LPS EN CORTEZA PREFRONTAL.

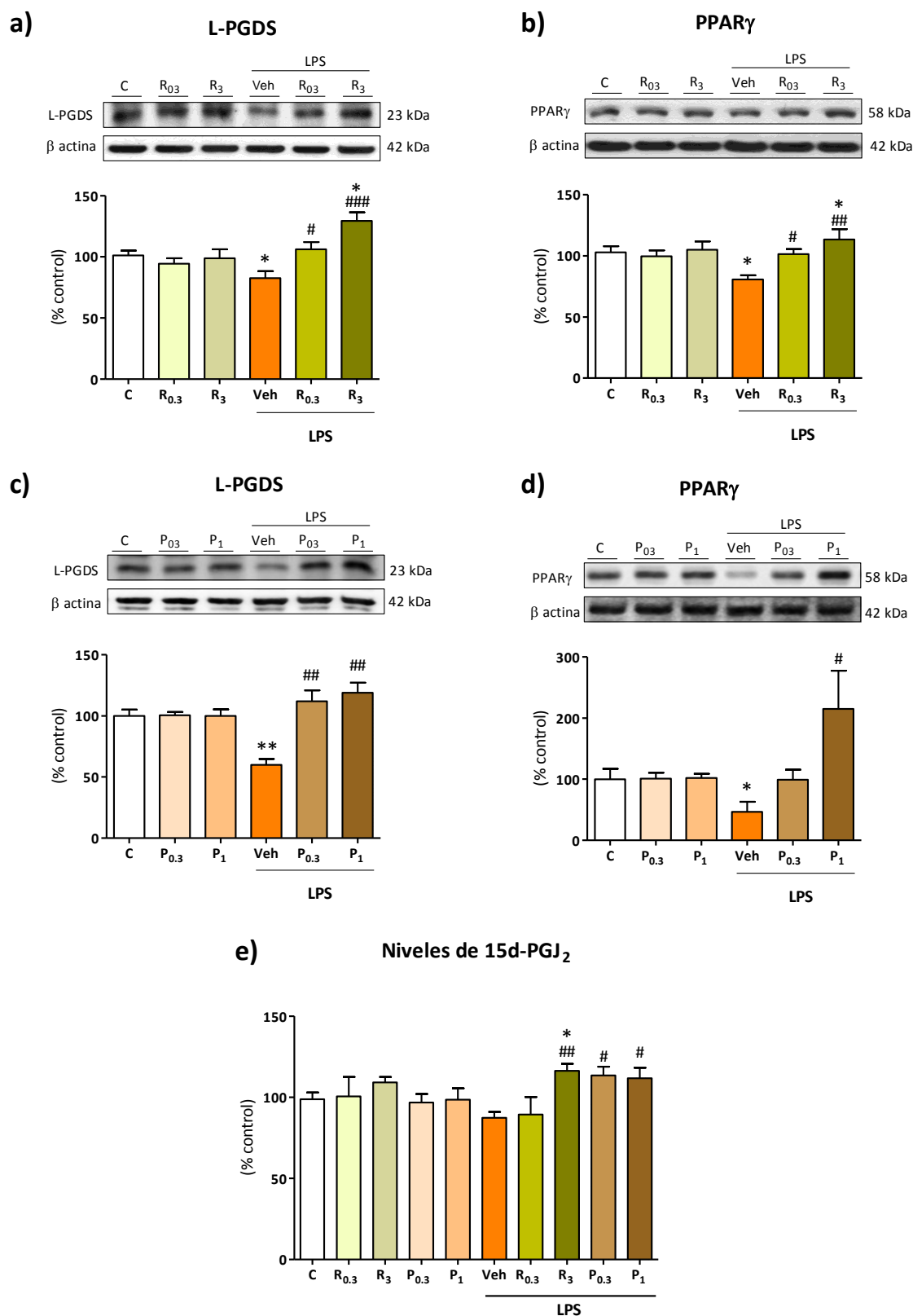
La inflamación es un mecanismo de respuesta endógeno, minuciosamente regulado a nivel intra e intercelular. Uno de los mecanismos, con anterioridad descrito en cerebro y otros tejidos, se desencadena a partir de la hiperactividad funcional de COX-2 (*García-Bueno et al. 2008a*). La activación de esta vía pone en marcha un mecanismo compensatorio que está mediado por la actividad de la prostaglandina antiinflamatoria 15-deoxi- prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), agonista endógeno de los receptores PPAR $\gamma$ .

Al explorar esta vía no se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de la enzima que sintetiza la prostaglandina 15d-PGJ<sub>2</sub>, L-PGDS, ni en su receptor PPAR $\gamma$ , entre el grupo expuesto a LPS y el grupo control, pero sí se aprecia un aumento de los niveles de mRNA en los grupos tratados con PALI con respecto al grupo expuesto a LPS y al grupo control en el caso de la L-PGDS, también se observa un aumento en los niveles de mRNA de PPAR $\gamma$  en los tratados con PALI respecto al grupo expuesto a LPS. Por otro lado, solo el tratamiento de mayor dosis de RSP induce un aumento en los niveles de mRNA de L-PGDS respecto al grupo expuesto a LPS, en tanto ambas dosis inducen un aumento en los niveles de mRNA de PPAR $\gamma$  respecto al grupo tratado con LPS (Fig.29).



**Figura 29. Efecto de RSP/PALI en los mediadores antiinflamatorios en Corteza Prefrontal.** Niveles de mRNA de L-PGDS (a) y PPAR $\gamma$  (b) en corteza prefrontal de ratas control (C, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>) y expuestas a LPS (Veh, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-8). \*p<0.05 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+LPS. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls

Por otro lado, tanto la enzima de síntesis L-PGDS, como el receptor PPAR $\gamma$  tienen los niveles proteicos disminuidos tras la exposición a LPS con respecto al grupo control (Fig.30a-d). Ambas dosis de RSP y PALI previenen el decaimiento de los niveles proteicos de L-PGDS inducidos por LPS (Fig.30a, c). De igual manera RSP previene la disminución de los niveles de PPAR $\gamma$  (Fig.30b), en cambio solo la dosis mayor de PALI reproduce dicho efecto (Fig.30d). Los cambios inducidos por el LPS no producen una disminución significativa en los niveles de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, pero los tratamientos de PALI y el de 3mg/kg RSP producen un aumento significativo de los niveles de la prostaglandina respecto al grupo expuesto solo a LPS (87.39% LPS vs 113.53%; 111.71%; 111.77% respectivamente) (Fig. 30e).



**Figura 30. Efecto de RSP/PALI en los mediadores antiinflamatorios en Corteza Prefrontal.** Niveles proteicos de L-PGDS y PPAR $\gamma$  (a-d), niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> (e) en corteza prefrontal de ratas control (C, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>) y expuestas a LPS (Veh, R<sub>0.3</sub>, R<sub>3</sub>, P<sub>0.3</sub> y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-8). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+LPS. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls.

### 1.5 EFECTO DE RISPERIDONA/PALIPERIDONA EN LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS PERIFÉRICOS INDUCIDOS POR LPS.

Con la finalidad de explorar los posibles efectos en el balance inflamatorio de estos antipsicóticos a nivel sistémico, se estudiaron diversos marcadores biológicos en extractos citosólicos y/o nucleares de células mononucleares periféricas (PBMC), y se evaluaron los niveles de nitritos en plasma.

En el modelo neuroinflamatorio, se puede apreciar como el LPS induce un aumento significativo de los niveles de las enzimas proinflamatorias iNOS, COX-2 y mPGES-1, al igual que los niveles de nitritos, en cambio la expresión del receptor PPAR $\gamma$  no se ve afectada a nivel periférico de manera significativa con respecto al grupo control (Tabla 4 y 5). En los grupos de animales pretratados con el antipsicótico RSP a una dosis de 3 mg/kg los parámetros inflamatorios tienden a normalizarse respecto al grupo control, siendo estadísticamente significativo la prevención del aumento de los niveles de nitritos inducidos por LPS, de igual manera el tratamiento aumento la expresión de los niveles de los receptores PPAR $\gamma$  respecto al grupo expuesto a LPS (Tabla 4). Dichos efectos también se aprecian en los animales pretratados con la dosis menor de RSP, aunque también se observa una disminución significativa en los niveles de la enzima COX-2 en comparación al grupo tratado con LPS (Tabla 4)

Parámetro	Control(AU)	Veh+LPS (%)	R <sub>0.3</sub> +LPS (%)	R <sub>3</sub> +LPS (%)
iNOS (AU)	1.06±0.1	<b>122.06±5.97*</b>	95.1±5.59	95.7±9.25
COX-2 (AU)	1.07±0.1	<b>122.32±2.90*</b>	<b>90.21±4.49<sup>#</sup></b>	93.02±9.02
mPGES-1 (AU)	0.75±0.008	<b>111.9±4.78*</b>	98.74±6.31	102.7±7.33
PPAR $\gamma$ (AU)	1.25±0.03	96.4±2.72	<b>130.8±10.3<sup>##</sup></b>	<b>119.6±2.97<sup>##</sup></b>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM/ml plasma)	8.86±0.6	<b>199.9±23.2**</b>	<b>94.52±10.3<sup>##</sup></b>	<b>101.4±10.8<sup>#</sup></b>

**Tabla 4. Efectos periféricos de RSP.** Expresión proteica porcentual de enzimas proinflamatorias (iNOS, COX-2 y mPGES-1) y del receptor antiinflamatorio PPAR $\gamma$  de los grupos expuestos a LPS y a RSP+LPS respecto al grupo control en células mononucleares periféricas. Niveles de nitritos en plasma. AU, unidades arbitrarias. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls. \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. Control; # p<0.05, ## p<0.01 vs. Veh+LPS

De igual manera se evaluaron dichos parámetros en los grupos tratados con ambas dosis de PALI. La dosis menor de 0.3mg/kg previene el aumento de los parámetros inflamatorios (iNOS, COX-2 y nitritos) inducidos por el LPS, por otro lado la misma dosis induce un aumento significativo en los niveles del receptor PPAR $\gamma$  respecto al grupo expuesto a LPS. En cambio, la dosis mayor del tratamiento solo previene el aumento de los niveles plasmáticos de nitritos inducidos por LPS de manera significativa (Tabla 5).

Parámetro	Control(AU)	Veh+LPS (%)	P <sub>0.3</sub> +LPS (%)	P <sub>1</sub> +LPS (%)
iNOS (AU)	1.12±0.01	<b>121.2±5.1**</b>	<b>98.3±6.3<sup>#</sup></b>	100.1±7.8
COX-2 (AU)	0.95±0.04	<b>139.7±11.2*</b>	<b>96.1±7.6<sup>#</sup></b>	118.6±5.0
mPGES-1 (AU)	0.76±0.03	<b>127.4±7.7*</b>	111.6±2.3	127.6±7.6
PPAR $\gamma$ (AU)	1.19±0.07	88.08±7.5	<b>114.6±5.6<sup>#</sup></b>	98.9±5.8
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM/ml plasma)	10.58±0.41	<b>126.06±4.8**</b>	<b>92.0±6.3<sup>##</sup></b>	<b>103.9±3.3<sup>##</sup></b>

**Tabla 5. Efectos periféricos de PALI.** Expresión proteica porcentual de enzimas proinflamatorias (iNOS, COX-2 y mPGES-1) y del receptor antiinflamatorio PPAR $\gamma$  de los grupos expuestos a LPS y a PALI+LPS respecto al grupo control en células mononucleares periféricas. Niveles de nitritos en plasma. AU, unidades arbitrarias. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls. \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. Control; # p<0.05, ## p<0.01 vs. Veh+LPS

## 1.6 RESUMEN DE RESULTADOS:

Los resultados encontrados en corteza prefrontal derivados de este primer bloque, se resumen en la siguiente tabla:

Parámetro	Valor Control	%Veh	%RSP <sub>0.3</sub>	%RSP <sub>3</sub>	%PALI <sub>0.3</sub>	%PALI <sub>1</sub>
LPS						
mRNA TNF $\alpha$ (AU)	0.8 $\pm$ 0.06	124.8 $\pm$ 4.3***	118.7 $\pm$ 4.8*	95.31 $\pm$ 5.0 <sup>##</sup>	100.3 $\pm$ 2.8 <sup>##</sup>	100.2 $\pm$ 3.1 <sup>##</sup>
mRNA IL1 $\beta$ (AU)	0.53 $\pm$ 0.03	393.5 $\pm$ 29***	335.3 $\pm$ 52***	207.5 $\pm$ 51 <sup>##</sup>	129.6 $\pm$ 14 <sup>###</sup>	119.6 $\pm$ 16 <sup>###</sup>
TNF $\alpha$ (pg/mg prot)	306.7 $\pm$ 7.7	163.4 $\pm$ 11**	116.7 $\pm$ 6.7 <sup>#</sup>	100.6 $\pm$ 8.9 <sup>#</sup>	106 $\pm$ 9.9 <sup>#</sup>	98.87 $\pm$ 3.9 <sup>##</sup>
IL1 $\beta$ (pg/mg prot)	580.1 $\pm$ 19.2	144.5 $\pm$ 11*	111.8 $\pm$ 3.1 <sup>#</sup>	106.8 $\pm$ 14 <sup>#</sup>	99.9 $\pm$ 6.5 <sup>#</sup>	100.8 $\pm$ 9.0 <sup>#</sup>
mRNA NF $\kappa$ B (AU)	0.89 $\pm$ 0.04	121.0 $\pm$ 4.5**	110 $\pm$ 2.4	107.5 $\pm$ 6.1	115.1 $\pm$ 4.5	114.1 $\pm$ 4.3
mRNA I $\kappa$ B $\alpha$ (AU)	0.86 $\pm$ 0.04	329.8 $\pm$ 13***	354.2 $\pm$ 11***	225.9 $\pm$ 13 <sup>###</sup>	294.9 $\pm$ 32***	246.2 $\pm$ 35 <sup>##</sup>
mRNA iNOS (AU)	0.7 $\pm$ 0.05	189.4 $\pm$ 18***	132.5 $\pm$ 7.0 <sup>#</sup>	124.6 $\pm$ 11 <sup>#</sup>	139.8 $\pm$ 19	129.7 $\pm$ 23
mRNA COX-2 (AU)	0.9 $\pm$ 0.05	128.7 $\pm$ 2.7***	108.4 $\pm$ 7.2 <sup>#</sup>	88.43 $\pm$ 7.3 <sup>###</sup>	112.7 $\pm$ 5.9 <sup>#</sup>	109.8 $\pm$ 5.0 <sup>##</sup>
mRNA mPGES-1 (AU)	0.76 $\pm$ 0.06	169.9 $\pm$ 11***	146.2 $\pm$ 14*	102.7 $\pm$ 9.9 <sup>###</sup>	128.6 $\pm$ 9.2	136.6 $\pm$ 17
PGE2 (pg/mg prot)	60.3 $\pm$ 5.4	174.8 $\pm$ 10***	94.07 $\pm$ 13 <sup>##</sup>	104 $\pm$ 7.3 <sup>##</sup>	118.1 $\pm$ 17 <sup>#</sup>	128.3 $\pm$ 9.1 <sup>##</sup>
MDA (nmol/mg prot)	1.76 $\pm$ 0.1	153.5 $\pm$ 9.7**	110.8 $\pm$ 19	96.49 $\pm$ 15 <sup>#</sup>	120 $\pm$ 19	103.9 $\pm$ 9.3 <sup>#</sup>
Nitritos ( $\mu$ M/mg prot)	1.23 $\times 10^{-3}$ $\pm 1 \times 10^{-4}$	119.7 $\pm$ 4.7*	109.9 $\pm$ 12	91.29 $\pm$ 2.2 <sup>##</sup>	104.1 $\pm$ 4.7	101.6 $\pm$ 6.2
mRNA PPAR $\gamma$ (AU)	0.79 $\pm$ 0.07	93.2 $\pm$ 2.9	105.4 $\pm$ 3.7 <sup>#</sup>	107.6 $\pm$ 1.9 <sup>##</sup>	117.6 $\pm$ 5.2 <sup>##</sup>	123.2 $\pm$ 4.2 <sup>##</sup>
mRNA PGDS (AU)	0.79 $\pm$ 0.06	96.3 $\pm$ 3.0	107.2 $\pm$ 6.4	121.4 $\pm$ 14 <sup>#</sup>	124.1 $\pm$ 7.4* <sup>##</sup>	124.5 $\pm$ 8.3* <sup>##</sup>
15d-PGJ2 (pg/mg prot)	76.3 $\pm$ 4.3	87.3 $\pm$ 3.6	89.4 $\pm$ 10	116.3 $\pm$ 4.3* <sup>###</sup>	113.5 $\pm$ 5.3 <sup>#</sup>	111.7 $\pm$ 6.3 <sup>#</sup>
WB NF $\kappa$ B (AU) -RSP-	0.69 $\pm$ 0.04	107.9 $\pm$ 4.2*	117 $\pm$ 4.0**	85.7 $\pm$ 4.3 <sup>##</sup>	-	-
WB I $\kappa$ B $\alpha$ (AU) -RSP-	1.03 $\pm$ 0.04	93.7 $\pm$ 2.9	104.6 $\pm$ 8	107.5 $\pm$ 7	-	-
WB iNOS (AU) -RSP-	0.91 $\pm$ 0.08	153.3 $\pm$ 9.5***	128.3 $\pm$ 12 <sup>#</sup>	119 $\pm$ 5.9 <sup>#</sup>	-	-
WB COX-2 (AU) -RSP-	0.79 $\pm$ 0.05	158 $\pm$ 11***	144 $\pm$ 5.4**	113.4 $\pm$ 4.7 <sup>##</sup>	-	-
WB mPGES1(AU)-RSP-	0.78 $\pm$ 0.04	139.5 $\pm$ 6.1***	120.7 $\pm$ 7.2* <sup>#</sup>	117.6 $\pm$ 5.8 <sup>#</sup>	-	-
WB PPAR $\gamma$ (AU) -RSP-	1.12 $\pm$ 0.06	80.6 $\pm$ 3.3*	101.6 $\pm$ 4.0 <sup>#</sup>	113.5 $\pm$ 8.3* <sup>##</sup>	-	-
WB PGDS (AU) -RSP-	0.79 $\pm$ 0.03	82.5 $\pm$ 5.7*	106.1 $\pm$ 5.8 <sup>#</sup>	129.4 $\pm$ 6.9* <sup>##</sup>	-	-
WB NF $\kappa$ B (AU) -PALI-	0.37 $\pm$ 0.01	213.1 $\pm$ 29**	-	-	128.6 $\pm$ 12 <sup>#</sup>	139.4 $\pm$ 16 <sup>#</sup>
WB I $\kappa$ B $\alpha$ (AU) -PALI-	0.40 $\pm$ 0.02	72.8 $\pm$ 9.6*	-	-	119 $\pm$ 22	136.7 $\pm$ 13 <sup>#</sup>
WB iNOS (AU) -PALI-	0.35 $\pm$ 0.01	285.6 $\pm$ 22***	-	-	185.2 $\pm$ 26 <sup>##</sup>	158.4 $\pm$ 30 <sup>##</sup>
WB COX-2 (AU) -PALI-	0.92 $\pm$ 0.09	165.6 $\pm$ 28*	-	-	115.4 $\pm$ 7.4 <sup>#</sup>	96.38 $\pm$ 3.5 <sup>#</sup>
WB mPGES1 (AU) -PALI-	1.21 $\pm$ 0.04	122.5 $\pm$ 4.4*	-	-	113.3 $\pm$ 3.8	105.3 $\pm$ 6.4 <sup>#</sup>
WB PPAR $\gamma$ (AU) -PALI-	0.45 $\pm$ 0.05	46.6 $\pm$ 16*	-	-	99.01 $\pm$ 16	215 $\pm$ 62 <sup>#</sup>
WB PGDS (AU) -PALI-	0.44 $\pm$ 0.04	59.8 $\pm$ 4.8**	-	-	111.9 $\pm$ 9.0 <sup>##</sup>	119.1 $\pm$ 8.1 <sup>##</sup>

**Tabla Resumen 1. Resumen de resultados de los efectos de los antipsicóticos RSP/PALI en un modelo neuroinflamatorio inducido por LPS.** Expresión proteica y niveles de mRNA de diversos parámetros proinflamatorios y antiinflamatorios expresados en porcentaje, de los grupos tratados con antipsicóticos y expuestos a LPS con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, o según se indique). AU, unidades arbitrarias. Test estadístico ANOVA \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+LPS

## 2. NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar los efectos de la paliperidona (1 mg/kg, v.o.) frente a un estímulo inflamatorio fisiológico como el estrés, que se ha relacionado con la activación del sistema inmune, y constituye un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades psiquiátricas. Para ello se analizaron diversos parámetros inflamatorios relacionados con la activación de la vía del TLR4 en animales expuestos a estrés agudo (6 h) o crónico (6 h/día durante 21 días) mediante movilidad restringida, dichos efectos se evaluaron tanto a nivel de la corteza prefrontal (PFC) como a nivel periférico en colon, PBMC o plasma.

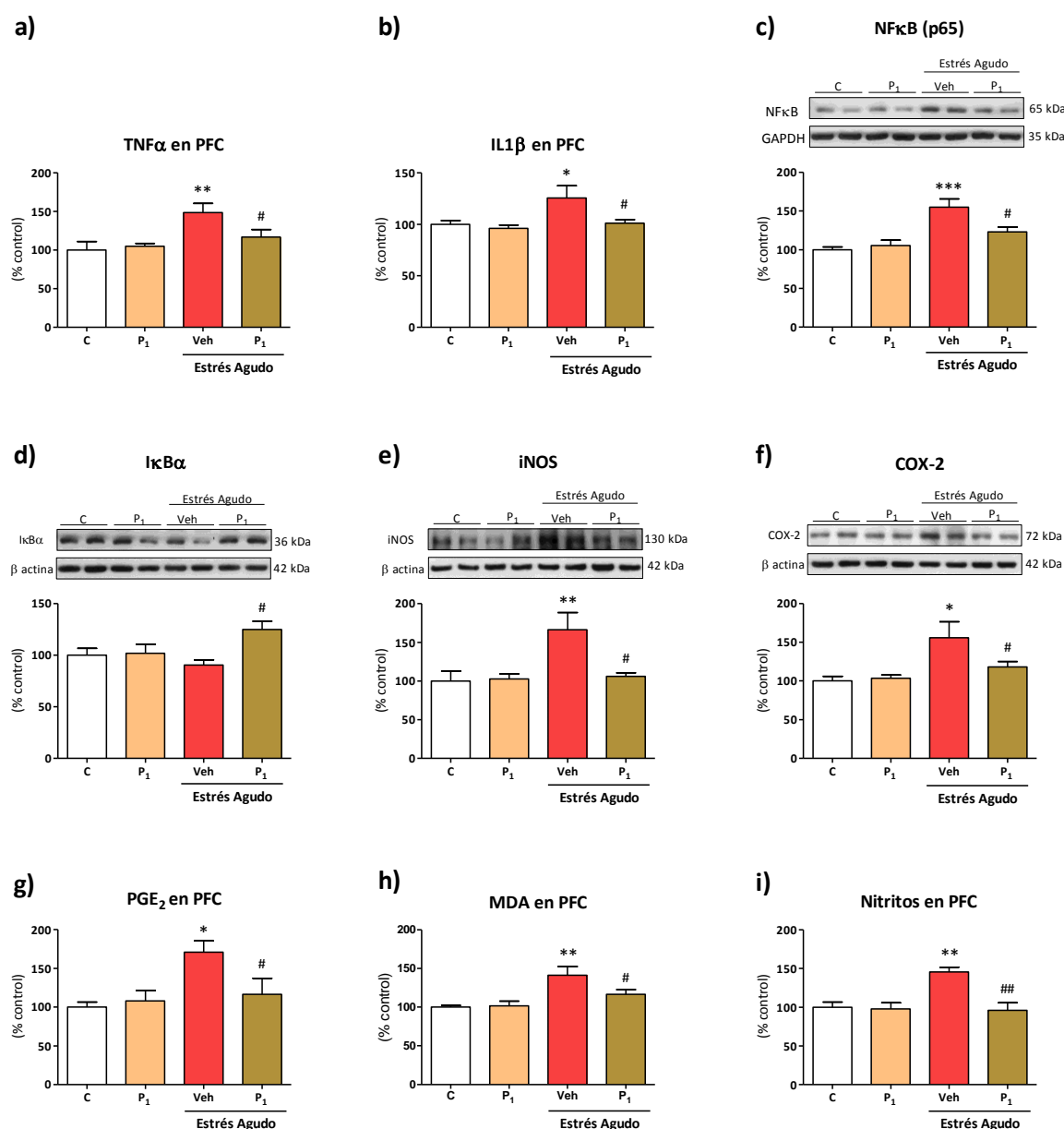
### 2.1 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS EN CORTEZA PREFRONTAL.

En primer lugar analizamos diversos parámetros inflamatorios, en el modelo animal de estrés y el consiguiente efecto del antipsicótico Paliperidona frente a dicho estímulo.

La exposición a estrés agudo induce un aumento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (Fig.31a, b), lo cual induce la activación de la vía del NF $\kappa$ B mediante la degradación de su subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig.31c, d), lo que permite al factor de transcripción traslocar al núcleo, en donde se observan sus niveles proteicos aumentados significativamente, aunque no se aprecian cambios en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ . Dicho factor induce un aumento en los niveles de las enzimas proinflamatorias inducibles iNOS y COX-2 (Fig.31e, f), ésta última es responsable del aumento de los niveles de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub> (Fig.31g). Como consecuencia del aumento de estos parámetros inflamatorios inducidos por el estrés se observa un aumento significativo en los niveles de MDA y nitritos, el reflejo del daño celular derivado de la peroxidación de las membranas y la acumulación de los mediadores nitrosativos (Fig.31h, i). El tratamiento con paliperidona previo a la exposición a estrés, previene el aumento de la activación de dicha cascada inflamatoria/oxidativa en la corteza prefrontal, e incluso es capaz de inducir el aumento de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma (Fig.31a-i). Dichos resultados fueron corroborados mediante el análisis de los niveles de mRNA de los parámetros antes mencionados (Tabla 6).

Parámetro	Valor Control	% Veh Estrés	% PALI Agudo
mRNA TNF $\alpha$ (AU)	0.93 $\pm$ 0.02	129.0 $\pm$ 3.7***	109.1 $\pm$ 4.3 <sup>#</sup>
mRNA IL1 $\beta$ (AU)	0.95 $\pm$ 0.02	137.1 $\pm$ 8.0**	93.07 $\pm$ 5.4 <sup>###</sup>
mRNA NF $\kappa$ B (AU)	1.01 $\pm$ 0.03	124.2 $\pm$ 3.7**	95.92 $\pm$ 3.5 <sup>##</sup>
mRNA I $\kappa$ B $\alpha$ (AU)	1.08 $\pm$ 0.04	191.9 $\pm$ 21***	177.8 $\pm$ 9.5 <sup>&amp;&amp;</sup>
mRNA iNOS (AU)	0.70 $\pm$ 0.07	125.9 $\pm$ 4.1***	103.6 $\pm$ 2.7 <sup>##</sup>
mRNA COX-2 (AU)	0.91 $\pm$ 0.03	109.9 $\pm$ 1.7	94.92 $\pm$ 6.0
mRNA mPGES-1 (AU)	0.96 $\pm$ 0.03	144.6 $\pm$ 10.6***	115.4 $\pm$ 2.2 <sup>##</sup>

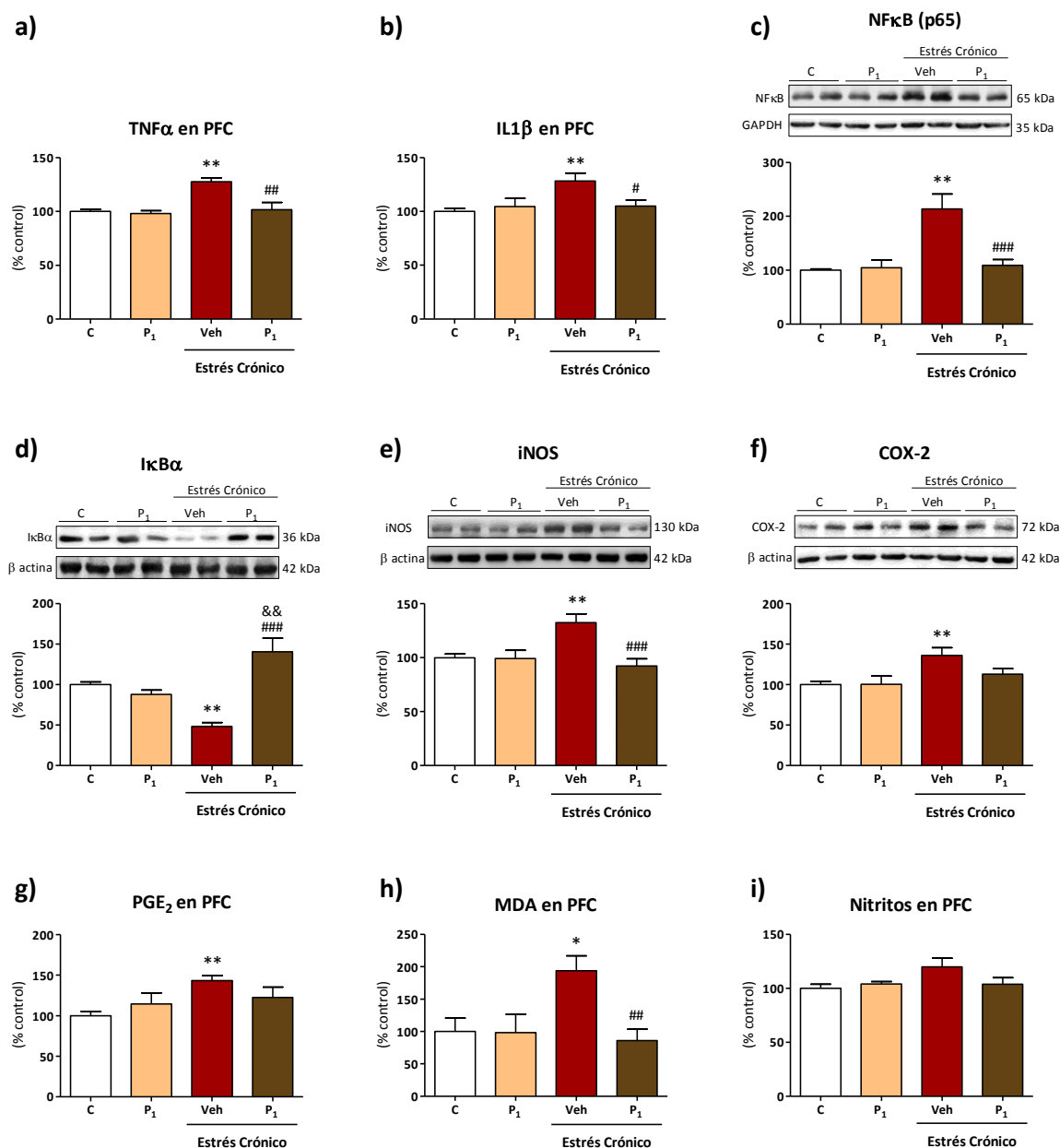
**Tabla 6. Efectos de Paliperidona a nivel de mRNA en un modelo neuroinflamatorio inducido por estrés agudo en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de diversos parámetros proinflamatorios expresados en porcentaje, del modelo inflamatorio y del grupo tratado con antipsicótico y expuesto a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; && p<0.01 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Estrés Agudo. Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM.



**Figura 31. Efecto de Paliperidona en la neuroinflamación inducida por estrés agudo en Corteza Prefrontal.** Niveles de citoquinas proinflamatorias TNFα e IL1β (a, b), niveles nucleares de NFκB (c), niveles citosólicos de IκBα (d), niveles de las enzimas inducibles iNOS y COX-2 (e, f), niveles de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub> (g) y niveles de daño celular MDA y nitritos (h, i) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés agudo (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=5). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. C; #p<0.05, ##p<0.01 vs Veh+Estrés Agudo. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Al evaluar los mismos parámetros, pero en el modelo de estrés crónico (6 horas de movilidad restringida al día, durante 21 días), encontramos que el estrés crónico induce un aumento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNFα e IL1β (Fig. 32a, b). La vía del NFκB se encuentra activa, en donde además de apreciar un aumento en los niveles de NFκB en el núcleo, también se puede observar la disminución de los niveles proteicos de la subunidad inhibitoria de NFκB, IκBα (Fig. 32c, d). Lo cual conlleva a que de igual manera que en el modelo de

estrés agudo los niveles proteicos de las enzimas iNOS y COX-2 se encuentran aumentados (Fig. 32e, f), al igual que los niveles de la prostaglandina proinflamatoria  $\text{PGE}_2$  (Fig. 32g). Como consecuencia de toda la cascada inflamatoria los niveles de peroxidación lipídica se encuentran aumentados significativamente (Fig. 32h), pero no los niveles de nitritos (Fig. 32i)



**Figura 32. Efecto de Paliperidona en la neuroinflamación inducida por estrés crónico en Corteza Prefrontal.** Niveles de citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (a, b), niveles nucleares de NFκB (c), niveles citosólicos de IκBα (d), niveles de las enzimas inducibles iNOS y COX-2 (e, f), niveles de la prostaglandina proinflamatoria  $\text{PGE}_2$  (g) y niveles de daño celular MDA y nitritos (h, i) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés crónico (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-7). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C; && p<0.01 vs P<sub>1</sub>; # p<0.05, ### p<0.01, #### p<0.001 vs Veh+Estrés Crónico. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Por su parte, el tratamiento diario con Paliperidona normaliza los parámetros proinflamatorios inducidos por el estrés crónico con respecto a los valores del grupo control, menos en los niveles proteicos de IκBα, que induce un aumento bajo condiciones de estrés.



A nivel del mRNA se observa que el estrés crónico induce el aumento de algunos parámetros proinflamatorios como NFκB, COX-2 y mPGES1, los cuales son normalizados por el tratamiento con paliperidona. Además, el antipsicótico induce un aumento en los niveles del mRNA de IκBα (Tabla 7)

Parámetro	Valor Control	% Veh Estrés	% PALI Crónico
mRNA TNFα (AU)	1.02±0.03	112.7±6.6	99.36±2.5
mRNA IL1β (AU)	1.06±0.09	109.4±7.1	93.23±4.3
mRNA NFκB (AU)	0.70±0.05	<b>111.7±3.7*</b>	<b>94.77±2.3<sup>##</sup></b>
mRNA IκBα (AU)	0.96±0.04	<b>120.8±5.9*</b>	<b>125.2±7.3<sup>&amp;</sup></b>
mRNA iNOS (AU)	1.01±0.06	114.0±8.2	<b>94.52±5.8<sup>#</sup></b>
mRNA COX-2 (AU)	1.09±0.06	<b>122.8±5.1**</b>	110.6±4.1
mRNA mPGES-1 (AU)	1.01±0.02	<b>124.1±5.9***</b>	<b>96.23±2.0<sup>###</sup></b>

**Tabla 7. Efectos de Paliperidona a nivel de mRNA en un modelo neuroinflamatorio inducido por estrés crónico en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de diversos parámetros proinflamatorios expresados en porcentaje, del modelo inflamatorio y del grupo tratado con antipsicótico y expuesto a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Estrés Crónico.

## 2.2 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS PERIFÉRICOS INDUCIDOS POR ESTRÉS

El estrés es capaz de inducir un leve aumento en los parámetros inflamatorios estudiados a nivel periférico, entre ellos el único que muestra un aumento significativo es COX-2 y los niveles de nitritos en el modelo crónico. El tratamiento con el antipsicótico paliperidona es capaz de prevenir dichos aumentos de manera significativa en los casos de COX-2 y los niveles de nitritos en ambos modelos de estrés, además de prevenir el aumento de mPGES-1 durante el protocolo de estrés agudo (Tabla 8).

Parámetro	Valor Control	% Veh Estrés	% PALI
iNOS (AU)	0.146±0.01	144.3±14.4	127.2±19.6
COX-2 (AU)	0.408±0.03	<b>149.2±15.9**</b>	<b>100.2±2.6<sup>##</sup></b>
mPGES-1 (AU)	0.508±0.02	115.1±10.1	<b>83.7±3.7<sup>#</sup></b>
PPARγ (AU)	0.373±0.03	113.2±3.9	142.1±21.3
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM/ml plasma)	17.44±1.26	118.9±4.2	<b>87.7±9.4<sup>#</sup></b>
iNOS (AU)	0.832±0.10	120.6±11.4	102.6±8.3
COX-2 (AU)	0.573±0.02	<b>116.1±2.48*</b>	<b>102.6±4.05<sup>#</sup></b>
mPGES-1 (AU)	0.492±0.04	117.7±9.70	99.7±10.5
PPARγ (AU)	0.612±0.09	70.61±10.68	105.4±19.01
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM/ml plasma)	14.22±0.87	<b>119.8±13.82*</b>	<b>86.95±7.42<sup>#</sup></b>

**Tabla 8. Efectos de Paliperidona en la inflamación inducida por estrés a nivel periférico.** Nivel de nitritos en plasma y niveles proteicos de diversos parámetros proinflamatorios en PBMC expresados en porcentaje, del modelo inflamatorio y del grupo tratado con antipsicótico y expuesto a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni. \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs. Control; & p<0.05 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01 vs. Veh+Estrés.

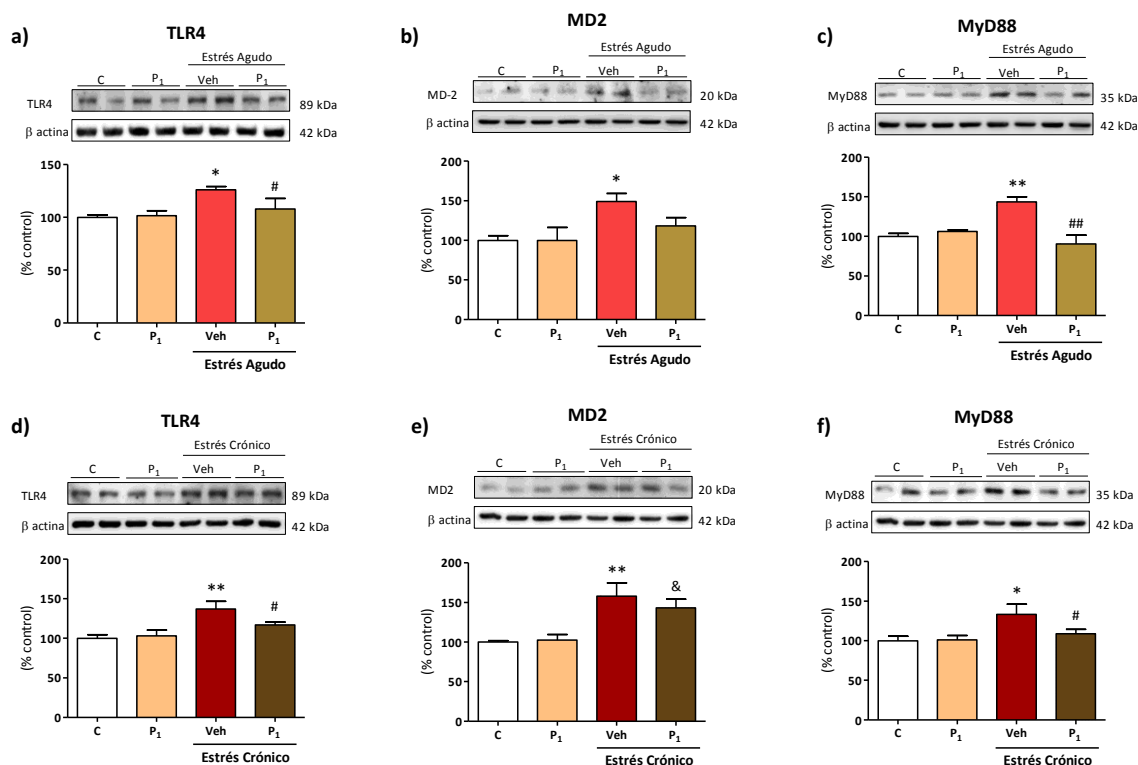
### 2.3 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL TLR4 INDUCIDA POR ESTRÉS EN CORTEZA PREFRONTAL.

Dado los resultados obtenidos al analizar los diversos parámetros inflamatorios en los modelos de estrés y el papel antiinflamatorio del antipsicótico, se sospechó que paliperidona podría estar actuando a nivel de la vía del receptor TLR4. La activación de dicho receptor conlleva a la activación de la vía del NFκB y la cascada inflamatoria previamente observada. Además, se ha comprobado en estudios previos de nuestro grupo que el estrés es capaz de regular al alza dicha vía (Gárate *et al.* 2011, 2013).

Ambos tipos de estrés aumentan los niveles proteicos de TLR4, MD2 y MyD88 (Fig. 33a-f). Dichos efectos fueron normalizados a los niveles del grupo control mediante el tratamiento de paliperidona, exceptuando la inducción del aumento de MD2 (Fig. 33b, e). Por otro lado, tanto el estrés agudo como el crónico indujeron un aumento en los niveles de mRNA de cada uno de los parámetros estudiados de la vía del TLR4 (Tabla 9), y de igual manera que en los niveles proteicos, el tratamiento con el antipsicótico inhibió el aumento inducido por el estrés.

Parámetro	Valor Control	% Veh	% PALI	
		Estrés		
mRNA TLR4 (AU)	0.86 ± 0.05	143.3±5.7***	112.1±3.6 <sup>##</sup>	Estrés Agudo
mRNA MD2 (AU)	0.98 ± 0.02	136.9±11.5**	115.2±5.7	
mRNA MyD88 (AU)	1.01 ± 0.04	133.0±1.6***	120.6±3.1 <sup>&amp;#</sup>	
mRNA TLR4 (AU)	1.18 ± 0.09	115.3±1.7*	95.72±5.5 <sup>##</sup>	Estrés Crónico
mRNA MD2 (AU)	1.09 ± 0.07	121.9±4.6**	101.9±5.5 <sup>##</sup>	
mRNA MyD88 (AU)	1.06 ± 0.02	118.4±4.5*	99.9±5.0 <sup>##</sup>	

**Tabla 9. Efectos de Paliperidona a nivel de mRNA en la activación de la vía del TLR4 mediante estrés agudo y crónico en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de TLR4, MD2 y MyD88 en porcentaje de los grupos estresados respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p< 0.05 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01 vs. Veh+Estrés Agudo/Crónico.

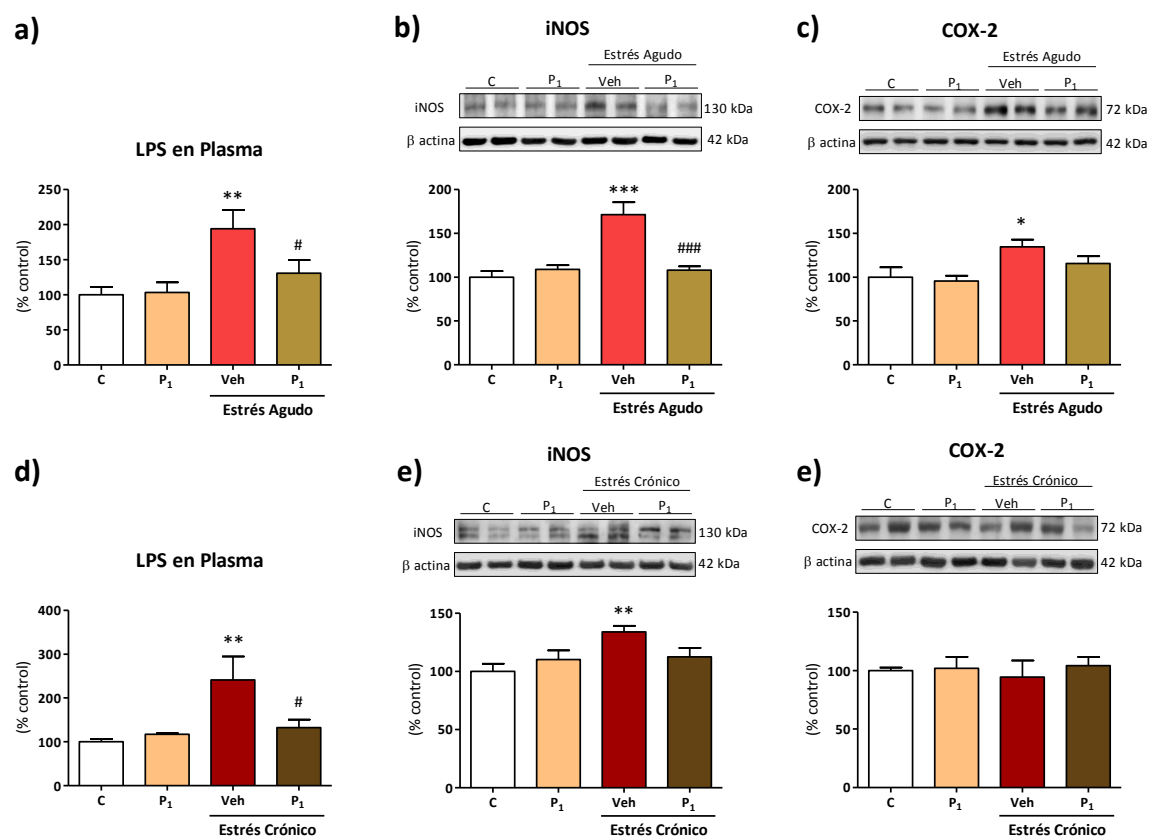


**Figura 33. Efecto de PALI en la activación de la vía del TLR4 inducida por estrés en Corteza prefrontal.** Niveles de TLR4, MD2 y MyD88 en estrés agudo (a-c) y estrés crónico (d-f) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=6-7 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C; & p<0.05 vs P<sub>1</sub>; # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

## 2.4 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA INFLAMACIÓN INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS.

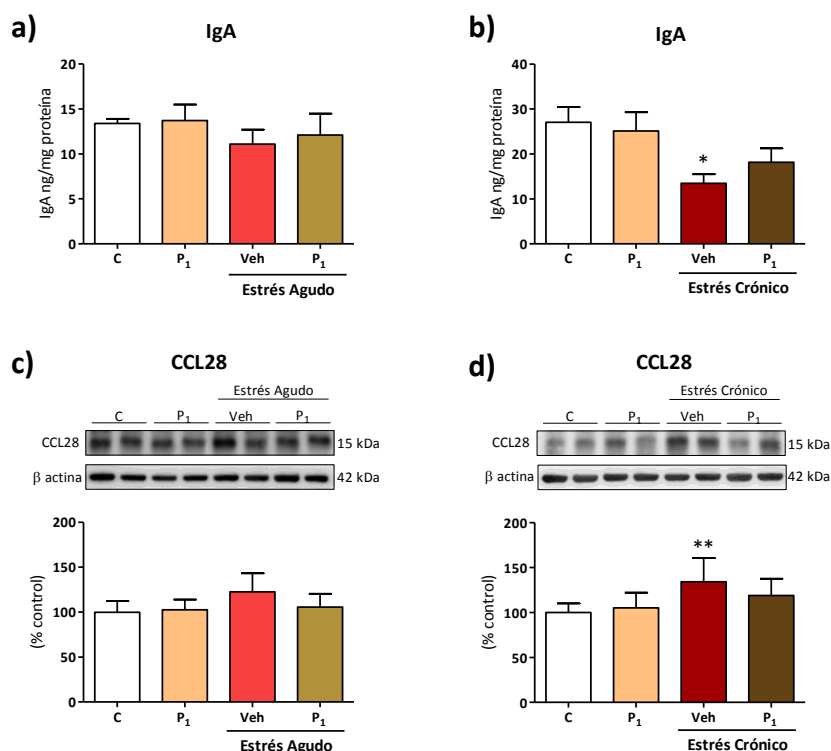
Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el estrés es capaz de inducir una inflamación localizada capaz de aumentar la permeabilidad intestinal que podría permitir una traslocación bacteriana o al menos el paso de patrones moleculares asociados a patógenos “PAMPs” como el LPS, el cuál es ligando del receptor TLR4. Es por ello que nuestro siguiente objetivo fue evaluar el estado inflamatorio intestinal y los niveles plasmáticos de LPS en ambos modelos de estrés.

El estrés induce un aumento en los niveles de LPS en el plasma tanto a nivel agudo como en el crónico (Fig. 34a, d), debido al aumento de la permeabilidad intestinal inducido por el estado inflamatorio del intestino, reflejo de esto es el aumento en los niveles proteicos de las enzimas inflamatorias COX-2 e iNOS en el modelo de estrés agudo (Fig. 34b, c), estado que se mantiene en el estrés crónico por el aumento en los niveles proteicos de iNOS, aunque no de COX-2 (Fig. 34e, f). Por su lado, el tratamiento con PALI previene el aumento de los niveles plasmáticos de LPS bajo ambas condiciones de estrés (Fig. 34a, d) y el aumento en la expresión de iNOS en el modelo agudo (Fig. 34b).



**Figura 34. Efecto de PALI en la activación de la vía del TLR4 inducida por estrés en Corteza prefrontal.** Niveles de TLR4, MD2 y MyD88 en estrés agudo (a-c) y estrés crónico (d-f) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=6-7 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; # p<0.05, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Para confirmar dicho desequilibrio inflamatorio se evaluó uno de los mecanismos protectores que tienen lugar en el intestino. Se cuantificaron los niveles proteicos de la quimioquina CCL28, que regula la migración de aquellas células que secretan IgA, la cual representa la primera línea de defensa frente a los patógenos y una disminución de sus niveles se relaciona con la disfunción intestinal y la traslocación bacteriana. Ninguno de estos parámetros se modificó durante el protocolo de estrés agudo ni durante el tratamiento con paliperidona (Fig.35 a, c). Por otro lado, el estrés crónico induce una disminución en los niveles de IgA y un aumento en los niveles de la quimioquina CCL28 en el colon de los animales estresados, el tratamiento con paliperidona no altera significativamente los efectos inducidos por el estrés crónico (Fig. 35b, d).

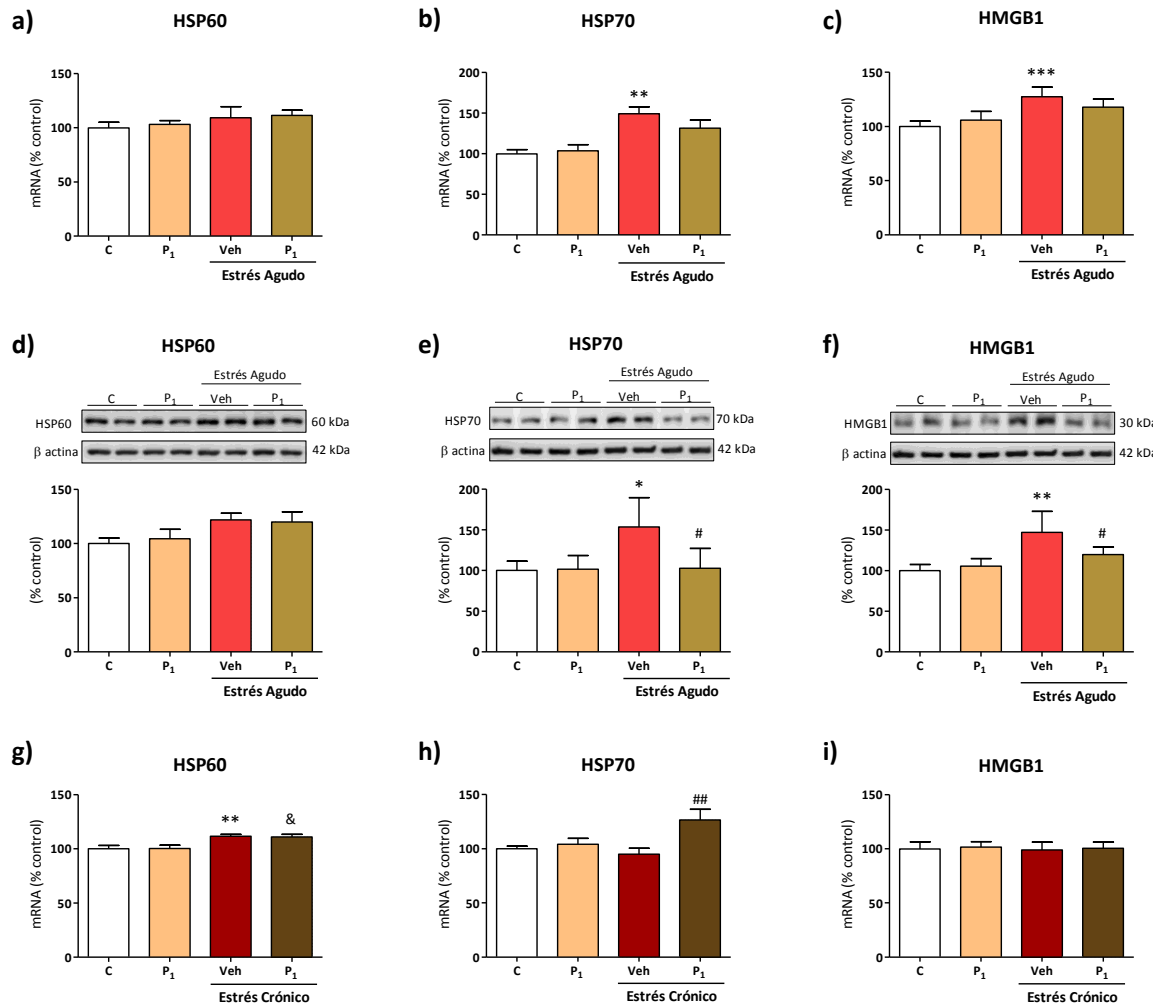


**Figura 35. Efecto de PALI en el mecanismo de defensa mediado por IgA frente a patógenos en colon.** Niveles de IgA (a,b) y niveles de la quimioquina CCL28 (c,d) en estrés agudo y crónico en colon de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=6-7 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

## 2.5 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL TLR4 INDUCIDA POR DAMPs

TLR4 es capaz de reconocer moléculas endógenas que se liberan cuando los tejidos son dañados, como las proteínas de choque térmico 60 y 70 (HSP 60/70) y el grupo proteico de alta movilidad B1 (HMGB1). La activación del receptor por estas señales de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) puede presentar un mecanismo regulatorio complementario sobre el cual actúe paliperidona bajo nuestras condiciones de estrés.

Bajo condiciones de estrés agudo se induce un aumento en los niveles de mRNA y proteicos de HSP70 y HMGB1, pero no de HSP60 (Fig. 36a-f). El pretratamiento con paliperidona es capaz de prevenir dicho aumento sólo a nivel proteico (Fig. 36e, f). Por otro lado, el estrés crónico sólo induce un aumento en el nivel de mRNA de HSP60, que no es prevenido por el tratamiento con paliperidona. Además, el antipsicótico induce un aumento en los niveles de mRNA de HSP70 bajo condiciones de estrés crónico.



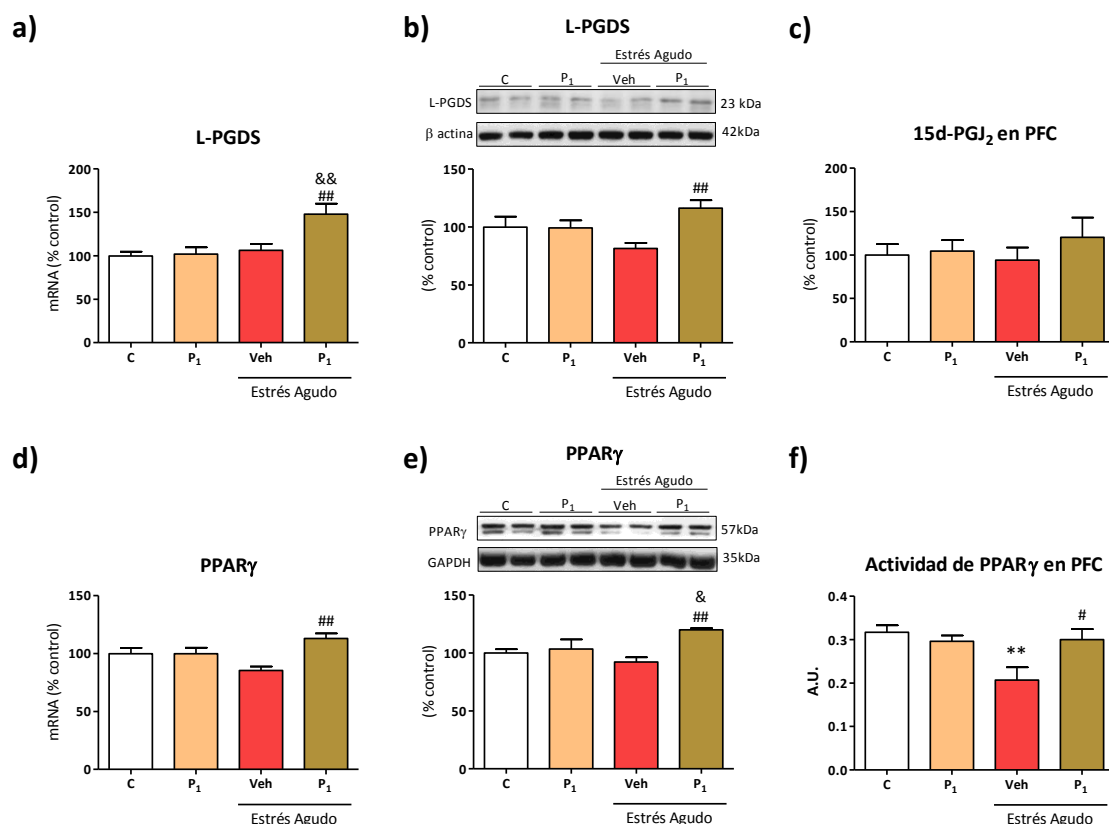
**Figura 36. Efecto de PALI en los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) en Corteza prefrontal.** Niveles de mRNA (a-c) y proteicos de HSP60, HSP70 y HMGB1 en estrés agudo (d-f), niveles de mRNA de HSP60, HSP70 y HMGB1 estrés crónico (g-i) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=6-7 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. C; &p<0.05 vs P<sub>1</sub>; #p<0.05, ##p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

## 2.6 EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN LA VÍA ANTIINFLAMATORIA 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$ en PFC.

El mecanismo antiinflamatorio orquestado por 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$ , desencadenado por la hiperactivación de COX-2, también se estudió en los modelos neuroinflamatorios inducidos por estrés.

Bajo condiciones de estrés agudo, tanto los niveles de mRNA como proteicos de la enzima de síntesis de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub>, L-PGDS, como el receptor de la misma, PPAR $\gamma$ , no presentan cambios, ni tampoco varían los niveles de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, pero si se observa una disminución en la actividad del receptor (Fig.37a-f). Por su parte, el tratamiento con paliperidona indujo un aumento en los niveles de mRNA y proteicos de L-PGDS respecto a los grupos control y al modelo neuroinflamatorio (Fig.37a, b), dichos cambios no llegan a traducirse en un aumento significativo de los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig.37c). Por otro lado, los niveles de mRNA y proteicos del

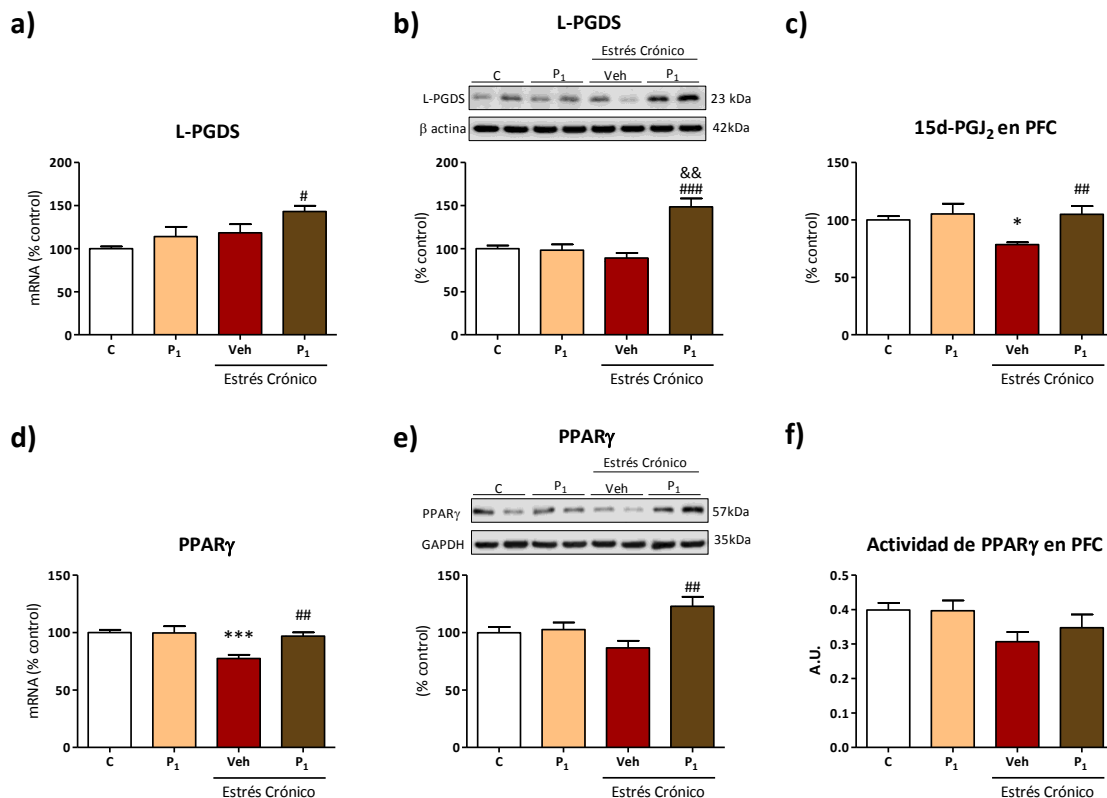
receptor PPAR $\gamma$  se encuentran elevados respecto al grupo expuesto solo a estrés (Fig.37d, e). Además, se previene la disminución de la actividad de PPAR $\gamma$  inducida por el estrés (Fig.37f).



**Figura 37. Efecto de PALI en los mediadores antiinflamatorios bajo condiciones de estrés agudo.** Niveles de mRNA y proteicos de L-PGDS (a, b), niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub> (c), niveles de mRNA y proteicos del receptor PPAR $\gamma$  (d, e), y nivel de actividad de PPAR $\gamma$  en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés agudo (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C; & p<0.05, && p<0.01 vs P<sub>1</sub> (sin estrés); # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

En el caso del modelo neuroinflamatorio inducido por estrés crónico, no se observan cambios en los niveles de mRNA ni en los de proteína de L-PGDS (Fig.38a, b). Sin embargo, se observa una disminución en los niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig.38c). Por otro lado, los niveles de mRNA del receptor PPAR $\gamma$  también se encuentran disminuidos (Fig.38d), aunque esto no se traduce en cambios en sus niveles proteicos ni en su actividad (Fig.38e, f).

El tratamiento con el antipsicótico induce un aumento en los niveles de mRNA y proteicos de L-PGDS respecto al grupo control y al grupo expuesto solo a estrés (Fig.38a, b). A su vez, previene la disminución de los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> y de los niveles de mRNA y proteicos de PPAR $\gamma$  inducidos por el estrés (Fig.38c-e). En la actividad del receptor no se observaron cambios (Fig.38f).



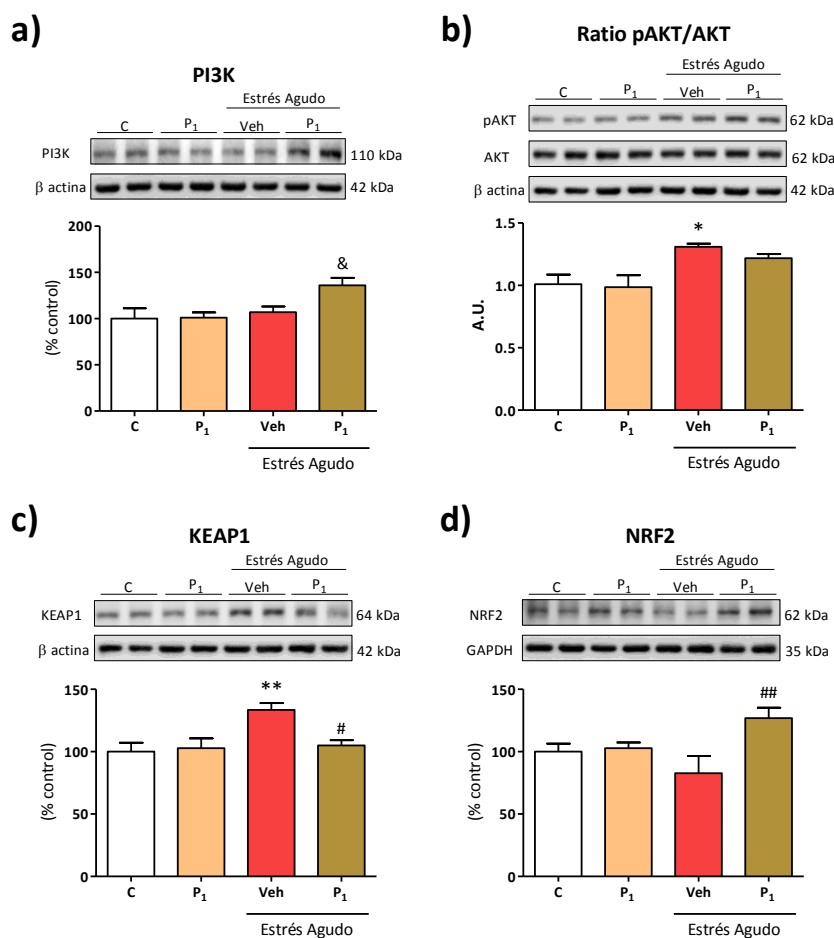
**Figura 38. Efecto de PALI en los mediadores antiinflamatorios bajo condiciones de estrés crónico.** Niveles de mRNA y proteicos de L-PGDS (a, b), niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub> (c), niveles de mRNA y proteicos del receptor PPAR<sub>γ</sub> (d, e), y nivel de actividad de PPAR<sub>γ</sub> en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés crónico (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=6-7). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; && p<0.01 vs P<sub>1</sub> (sin estrés); ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

## 2.7 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA VÍA ANTIOXIDANTE DE NRF2 EN PFC.

Uno de los mecanismos de defensa que se activan frente a la respuesta inflamatoria es la activación de la vía del NRF2, que promueve la síntesis de diversas proteínas con capacidad antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectoras. Por lo que nuestro siguiente objetivo fue evaluar la actividad de dicha vía en ambos modelos de neuroinflamación inducidos por estrés.

Entre los activadores de la vía se encuentran PI3K/AKT. Bajo condiciones de estrés agudo, no se observan cambios en los niveles proteicos de PI3K, pero si un aumento en los niveles de pAKT (Fig.39a, b). Por otro lado, la proteína inhibidora del factor de transcripción nuclear NRF2, KEAP1, se encuentra aumentada en el citoplasma, pero dicho cambio no modifica significativamente los niveles nucleares de NRF2 (Fig.39c, d). Por su parte, la paliperidona induce un aumento en los niveles de PI3K (Fig.39a), mientras que el aumento presentado en los niveles de pAKT no es significativo (Fig.39b). Además, el antipsicótico evita el aumento de los niveles de KEAP1 inducido por el estrés y favorece la traslocación de NRF2 desde el citoplasma al núcleo (Fig.39c, d).

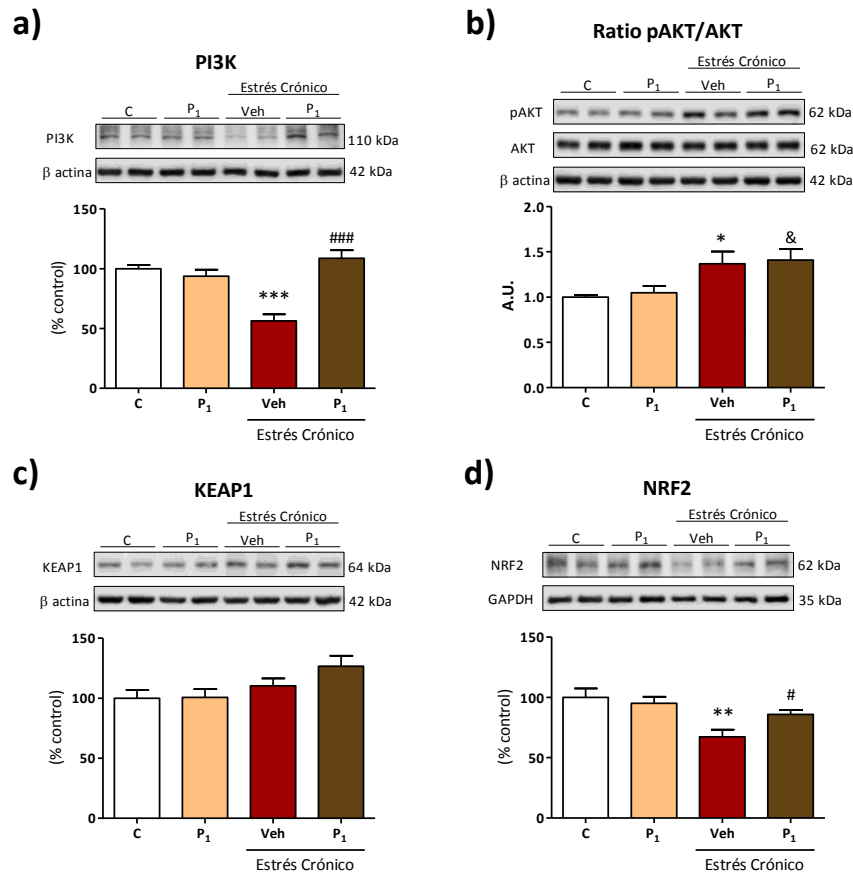




**Figura 39. Efecto de PALI en la activación de la vía del NRF2 bajo condiciones de estrés agudo.** Niveles de PI3K (a), ratio entre los niveles proteicos de pAKT y AKT total (b), niveles del inhibidor KEAP1 (c) y el factor de traslocación nuclear NRF2 (d) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés agudo (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5). \*p<0.05 vs. C; & p<0.05 vs P<sub>1</sub>; # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Bajo condiciones de estrés crónico, los niveles de PI3K se encuentran disminuidos, al contrario de los de pAKT que están aumentados (Fig.40a, b). A pesar de no observarse cambios en los niveles de KEAP1, los niveles nucleares de NRF2 están disminuidos (Fig.40c, d). El tratamiento con paliperidona evita la disminución de los niveles de PI3K, y no altera el aumento de pAKT inducido por el estrés (Fig.40a, b); respecto a los niveles de KEAP1 no se observan cambios, pero previene la disminución de los niveles de NRF2 inducidos por el estrés en el núcleo.

Los cambios observados en esta vía a nivel proteico fueron corroborados mediante la medición de los mismos elementos mediante sus niveles de mRNA. Bajo condiciones de estrés agudo, el único cambio observado es el aumento en los niveles de mRNA de AKT. Por su parte, la paliperidona induce un aumento en los niveles de PI3K, AKT y KEAP1 bajo condiciones de estrés (Tabla 10).



**Figura 40. Efecto de PALI en la activación de la vía del NRF2 bajo condiciones de estrés crónico.** Niveles proteicos de PI3K (a), ratio entre los niveles proteicos de pAKT y AKT total (b), niveles proteicos del inhibidor KEAP1 (c) y el factor de traslocación nuclear NRF2 (d) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés crónico (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-7). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; & p<0.05 vs P<sub>1</sub>; # p<0.05, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Por otro lado, el estrés crónico produce una disminución en los niveles de mRNA de PI3K y NRF2, que ya se había observado a nivel proteico, por su parte el tratamiento con el antipsicótico previene la disminución de dichos niveles (Tabla 10).

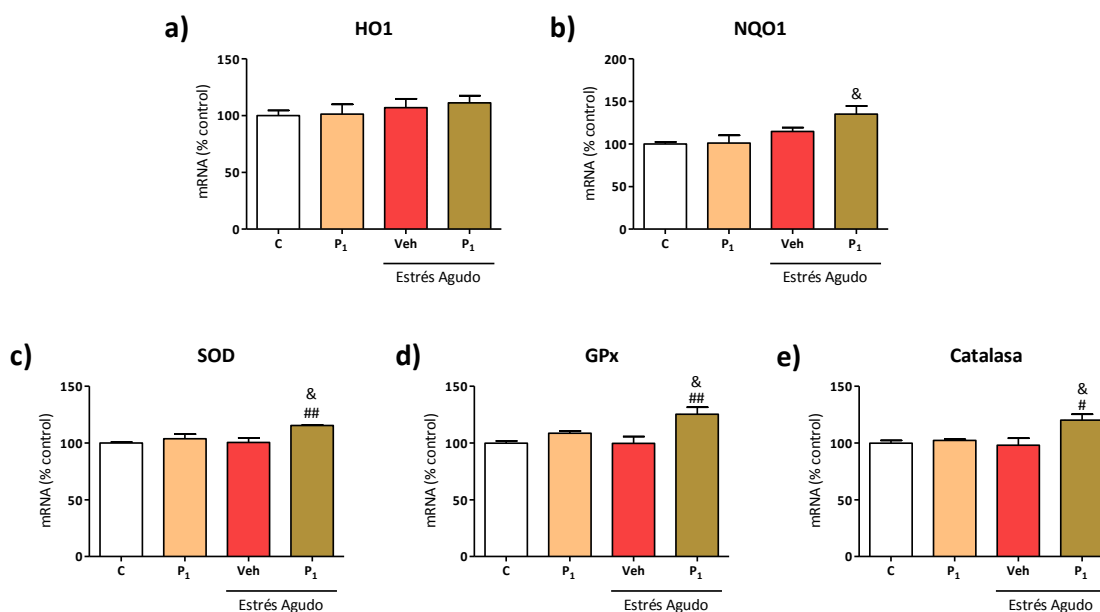
Parámetro	Valor Control	% Veh	% PALI	
		Estrés		
PI3K (AU)	1.06±0.06	112.8±3.50	119.7±2.69 <sup>&amp;</sup>	Estrés Agudo
AKT (AU)	0.98±0.01	119.1±4.41 <sup>**</sup>	127.5±4.15 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	
KEAP1 (AU)	1.19 ±0.06	114.9±3.74	128.9±5.89 <sup>&amp;&amp;</sup>	
NRF2 (AU)	0.97 ±0.05	105.4±3.75	99.97±8.12	
PI3K (AU)	1.08 ±0.04	83.09±3.25 <sup>**</sup>	100.4±2.58 <sup>##</sup>	Estrés Crónico
AKT (AU)	0.99 ±0.01	102.3±3.77	103.7±4.50	
KEAP1 (AU)	1.01 ±0.01	97.78±2.96	93.03±0.98	
NRF2 (AU)	1.06 ±0.02	87.12±2.42 <sup>*</sup>	105.3±2.54 <sup>##</sup>	

**Tabla 10. Efectos de Paliperidona en los niveles de mRNA de los elementos participantes en la vía del NRF2.**

Niveles de mRNA de PI3K, AKT, KEAP1 y NRF2 en porcentaje de los grupos estresados respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs. Control; & p<0.05, && p<0.01, &&& p<0.001 vs Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01 vs. Veh+Estrés Agudo/Crónico.

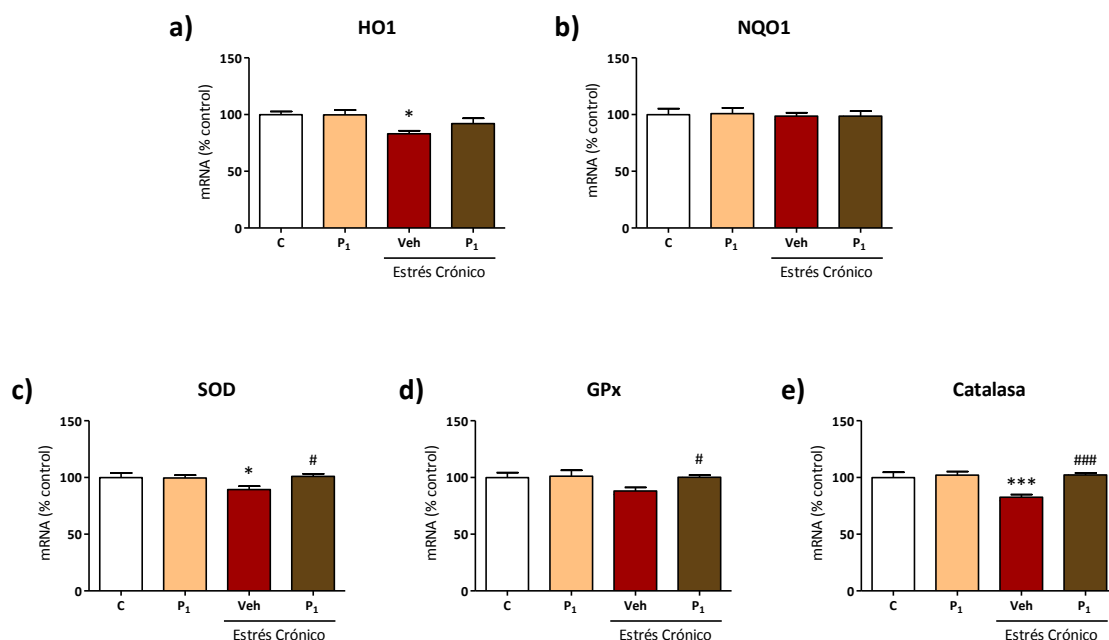
La activación de la vía del NRF2 tiene como consecuencia la inducción de la síntesis de elementos de respuesta antioxidante (ARE). Algunas de estas enzimas son la hemo-oxigenasa 1 (HO1), NADPH:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), Superóxido dismutasa (SOD), Glutathion peroxidasa (GPx) y Catalasa. La acción de dichas enzimas atenúa la respuesta proinflamatoria dependiente de NFκB mediante mecanismos que aún no se conocen en su totalidad.

Bajo condiciones de estrés agudo, los niveles de mRNA de las enzimas antes citadas no se modifican, pero junto con el tratamiento de paliperidona se induce un aumento en NQO1, SOD, GPx y Catalasa respecto a los grupos control y al modelo inflamatorio *per se* (Fig.41a-e).



**Figura 41. Efecto de PALI en los productos de la vía del NRF2 bajo condiciones de estrés agudo.** Niveles de mRNA de Hemo oxigenasa 1 (HO1), NAD(P)H:Quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), Superóxido dismutasa (SOD), Glutathion peroxidasa (GPx) y Catalasa en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés agudo (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5). & p<0.05 vs P<sub>1</sub> (sin estrés); # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

En cambio, bajo condiciones de estrés crónico, ya se observa una disminución en los niveles de mRNA de algunas de las enzimas antioxidantes como HO1, SOD y Catalasa. La administración de paliperidona previene la disminución de los niveles de mRNA de SOD y Catalasa inducidos por el estrés, pero no modifica los valores de HO1 y NQO1 respecto al grupo control. Por otro lado, la paliperidona induce un aumento en los niveles de mRNA de GPx respecto al grupo solo expuesto a estrés (Fig.42a-e).



**Figura 42. Efecto de PALI en los productos de la vía del NRF2 bajo condiciones de estrés crónico.** Niveles de mRNA de Hemo oxigenasa 1 (HO1), NAD(P)H:Quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), Superóxido dismutasa (SOD), Glutathion peroxidasa (GPx) y Catalasa en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés crónico (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-7). \*p<0.05, \*\*\* p<0.001 vs. C; # p<0.05, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

## 2.8 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL (FENOTIPO M1/M2)

Como ya hemos visto, el sistema inmune es un factor clave en la plasticidad y homeostasis cerebral. Estudios recientes han demostrado que la polarización o fenotipo presentado por la microglía juega un papel crucial en la promoción o supresión de la inflamación. Para dicha polarización es fundamental el entorno de citoquinas en donde se encuentra inmersa la célula. Teniendo en cuenta, el perfil anticitoquina presentado por la paliperidona, nuestro siguiente objetivo fue evaluar los niveles de algunas citoquinas relacionadas con los fenotipos M1 y M2. Siguiendo con esta línea, nuestro siguiente objetivo fue analizar la presencia de algunos de los marcadores microgliales antiinflamatorio o de fenotipo M2, como la enzima Arginasa I (ArgI) y el receptor de folato R2 (FOLR2).

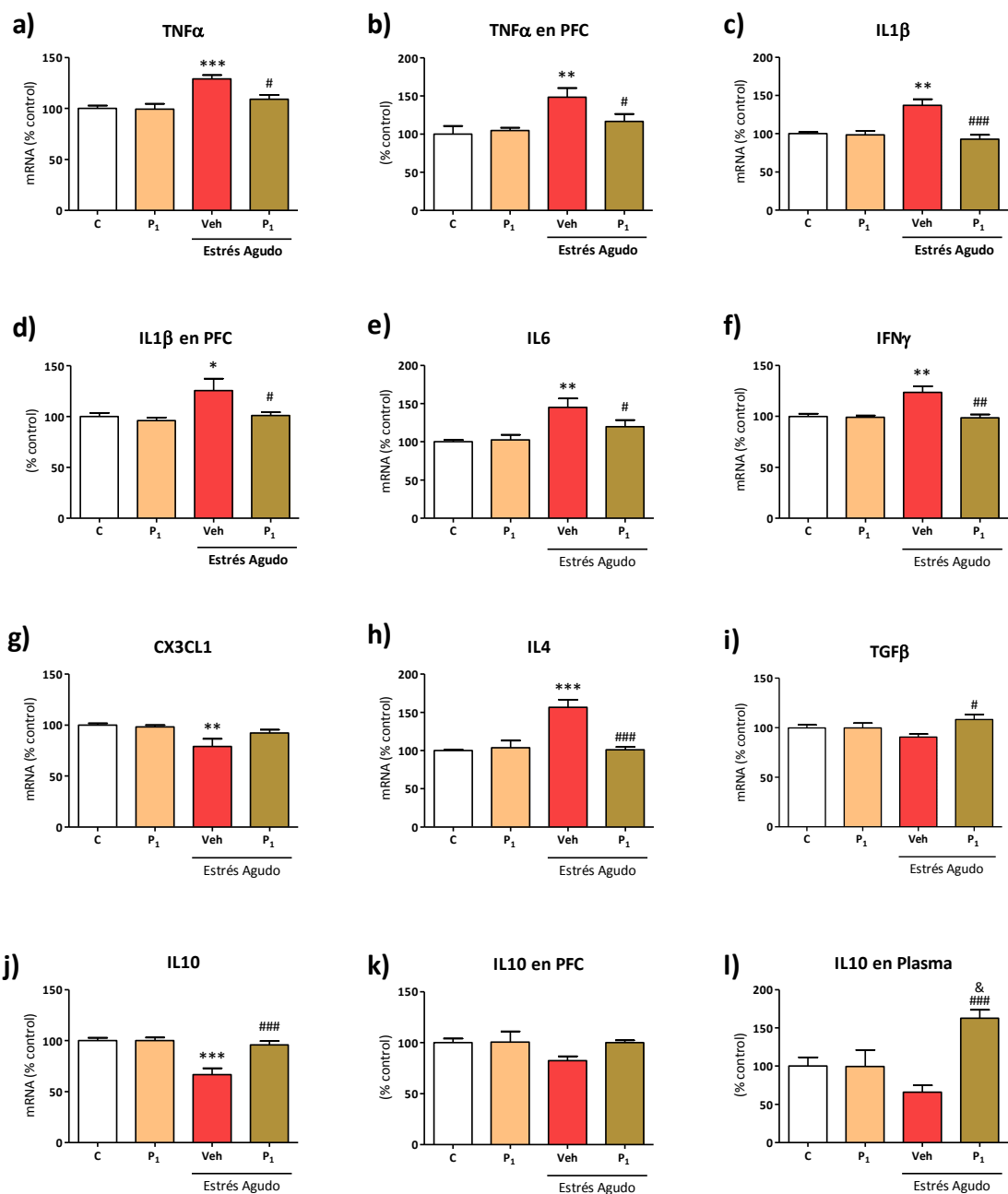
En primer lugar, se evaluaron los niveles de citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias en PFC, y además se midieron los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL10 en plasma. Bajo las condiciones de estrés agudo se aprecia un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IFN $\gamma$ , tanto a nivel de mRNA como proteico en el caso de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (Fig.43 a-f). La quimioquina fractalquina (CX3CL1), de naturaleza dual que participa tanto en procesos neurodegenerativos como neuroprotectores, presenta niveles de mRNA disminuidos (Fig.43g). Por otro lado, los niveles del mRNA de la citoquina IL4, inductora del fenotipo microglial antiinflamatorio M2a, se encuentran elevados (Fig.43h), otra citoquina antiinflamatoria inductora de fenotipos M2 es TGF $\beta$ , la cual no presentaba cambios bajo condiciones de estrés (Fig.43i). Finalmente los niveles de mRNA de la citoquina antiinflamatoria IL10 se encuentran

significativamente disminuidos, aunque dicha disminución no es significativa a nivel proteico en PFC ni en plasma (Fig.43j-l). Por su parte, el antipsicótico paliperidona previene el aumento de los niveles de las citoquinas proinflamatorias, ya sea a nivel de mRNA o de su proteína (Fig.43a-f). De igual manera reestablece los niveles de mRNA de IL-4 e IL10 (Fig.43h, j). Por otro lado, aumenta los niveles de TGF $\beta$  respecto al grupo expuesto sólo a estrés (Fig.43i) y también aumenta los niveles proteicos de IL10 en plasma respecto tanto al modelo inflamatorio como al grupo control (Fig.43l).

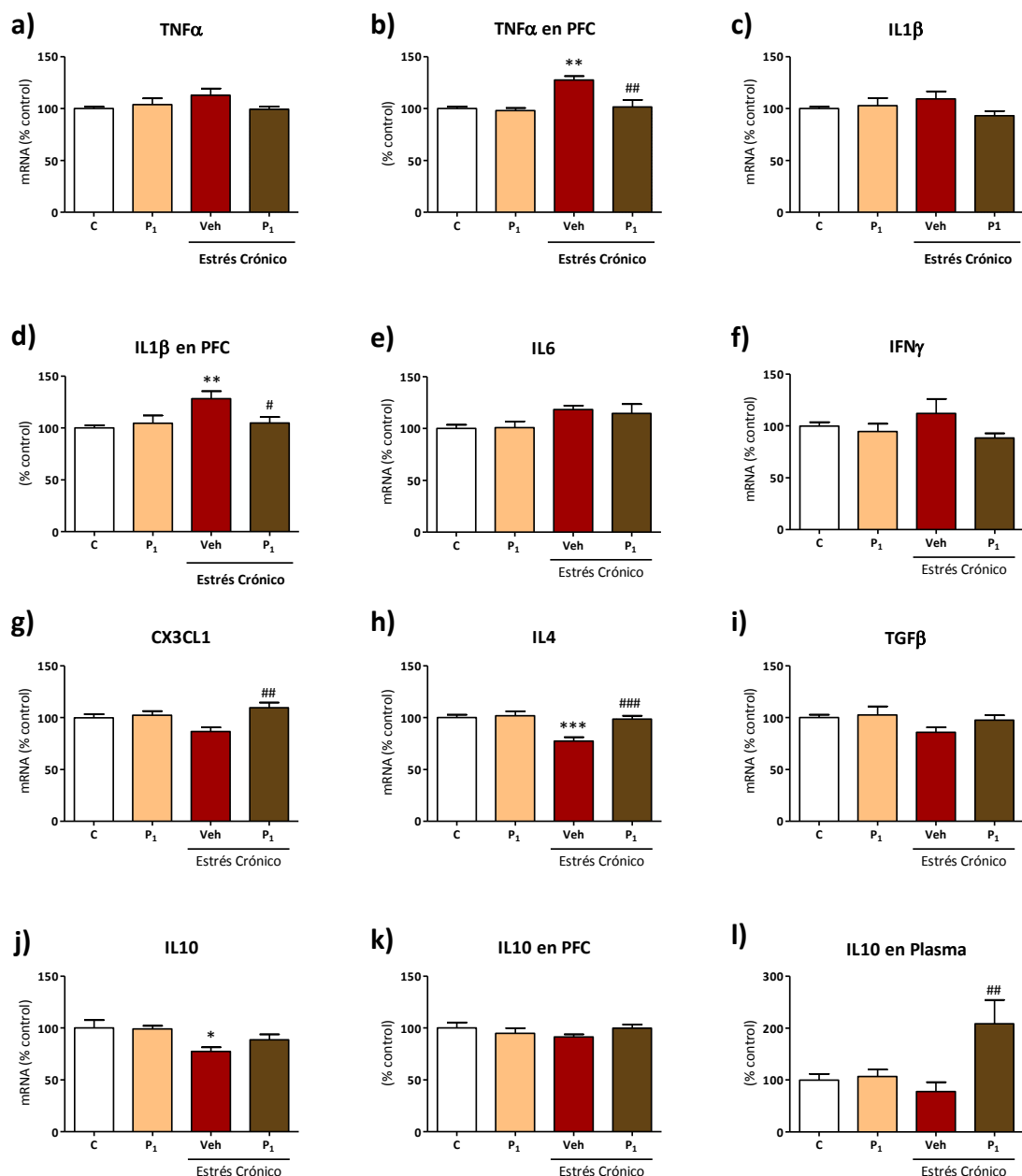
En cuanto al modelo crónico, los niveles de mRNA de las citoquinas proinflamatorias no se modifican bajo las condiciones de estrés, pero si aumentan los niveles proteicos de las citoquinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  en PFC (Fig.44a-d). Los niveles de mRNA de fractalquina y TGF $\beta$  no se alteran bajo condiciones de estrés, pero los de IL4 e IL10 si están disminuidos (Fig.44g-j). Sin embargo la disminución de los niveles de mRNA de IL10, no se traduce en una disminución de los niveles proteicos en PFC y plasma (Fig.44k, l). En cambio, la paliperidona previene el aumento de los niveles proteicos de las citoquinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  inducidos por el estrés (Fig.44b, d). Además, aumenta los niveles de mRNA de fractalquina respecto al grupo expuesto solo a estrés (Fig.44g). De igual manera, previene la disminución de los niveles mRNA de IL4 inducidos por el estrés (Fig.44.h). Finalmente, al igual que en el modelo inflamatorio inducido por estrés agudo, paliperidona induce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de IL10 respecto a los grupos control y al expuesto a estrés crónico (Fig.44l).

Al evaluar los marcadores microgliales antiinflamatorios (M2), Arg1 y FOLR2, se ha observado que bajo condiciones de estrés agudo los niveles de mRNA y proteicos de Arg1 no se modifican (Fig.45a, b), pero si aumentan los niveles de mRNA de FOLR2, aunque dicho cambio no se mantiene en los niveles proteicos del receptor (Fig.45c, d). Por su parte, paliperidona induce un aumento en los niveles de mRNA de ambos marcadores respecto al grupo control (Fig.45a, c), el aumento en los niveles de mRNA de Arg1 también es significativo respecto al grupo expuesto solo a estrés, y dicho aumento se conserva en los niveles proteicos (Fig.45a, b). Paliperidona también induce el aumento de los niveles proteicos de FOLR2 respecto al grupo control y al modelo neuroinflamatorio (Fig.45d).

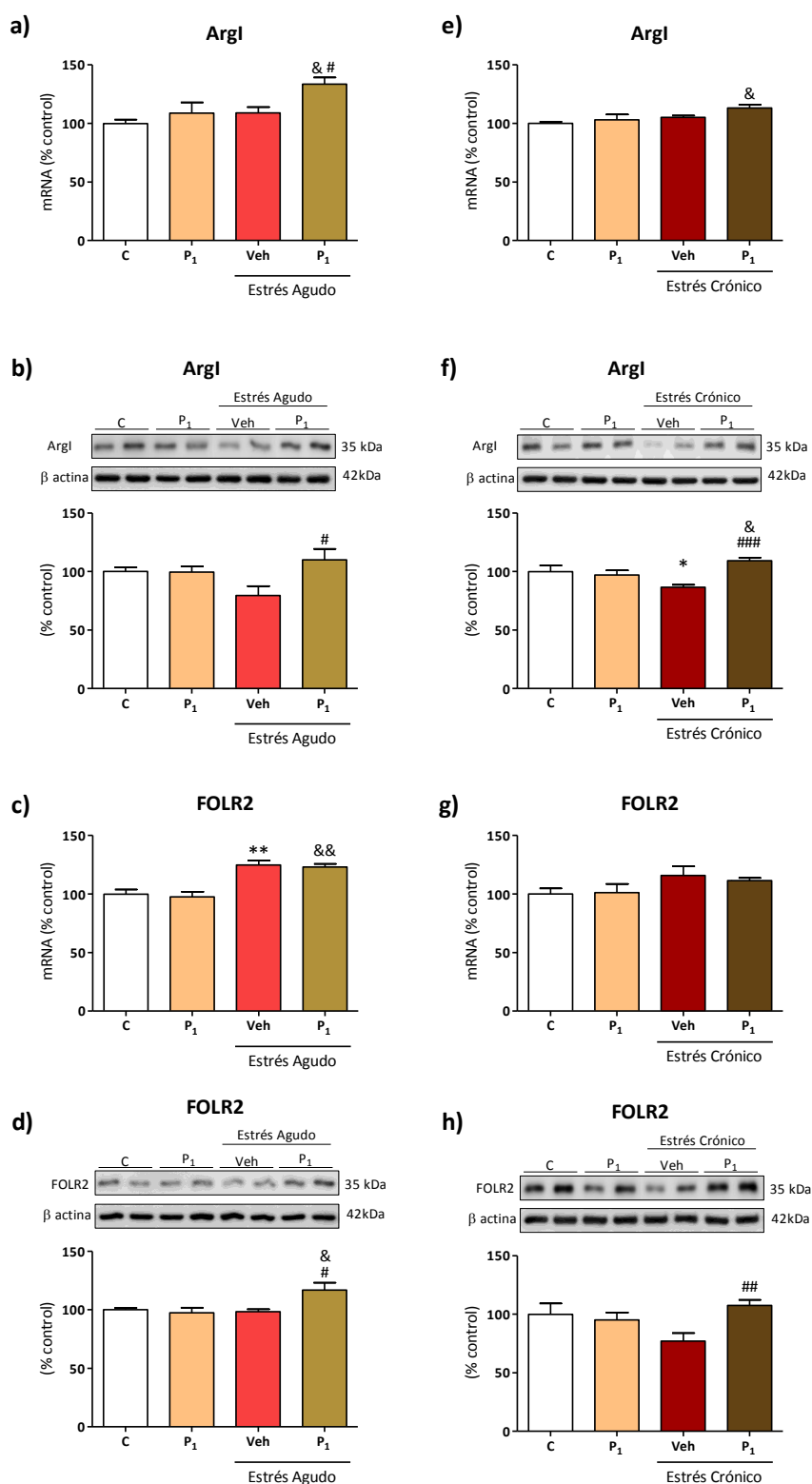
Bajo condiciones de estrés crónico, el único cambio observado es la disminución en los niveles proteicos de Arg1, el cual es reestablecido por el tratamiento con paliperidona (Fig.45f). Por otro lado, el antipsicótico induce un aumento en los niveles de mRNA de Arg1 respecto al grupo control y al expuesto a estrés (Fig.45e). El tratamiento con paliperidona no modifica los niveles de mRNA del receptor, pero si aumenta los niveles proteicos del mismo respecto al grupo expuesto solo a estrés (Fig.45g, h).



**Figura 43. Efecto de PALI en los niveles de citoquinas bajo condiciones de estrés agudo.** Niveles de mRNA y proteicos de TNF $\alpha$  (a,b) e IL1 $\beta$  (c,d), niveles de mRNA IL6, IFN $\gamma$ , IL4, TGF $\beta$ , fractalquina e IL10 (e-j); niveles proteicos de IL10 en PFC (k) y plasma (l) de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; & p<0.05 vs. P<sub>1</sub>; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.



**Figura 44. Efecto de PALI en los niveles de citoquinas bajo condiciones de estrés crónico.** Niveles de mRNA y proteicos de TNF $\alpha$  (a,b) e IL1 $\beta$  (c,d), niveles de mRNA IL6, IFN $\gamma$ , IL4, TGF $\beta$ , fractalquina e IL10 (e-j); niveles proteicos de IL10 en PFC (k) y plasma (l) de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=6-7). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

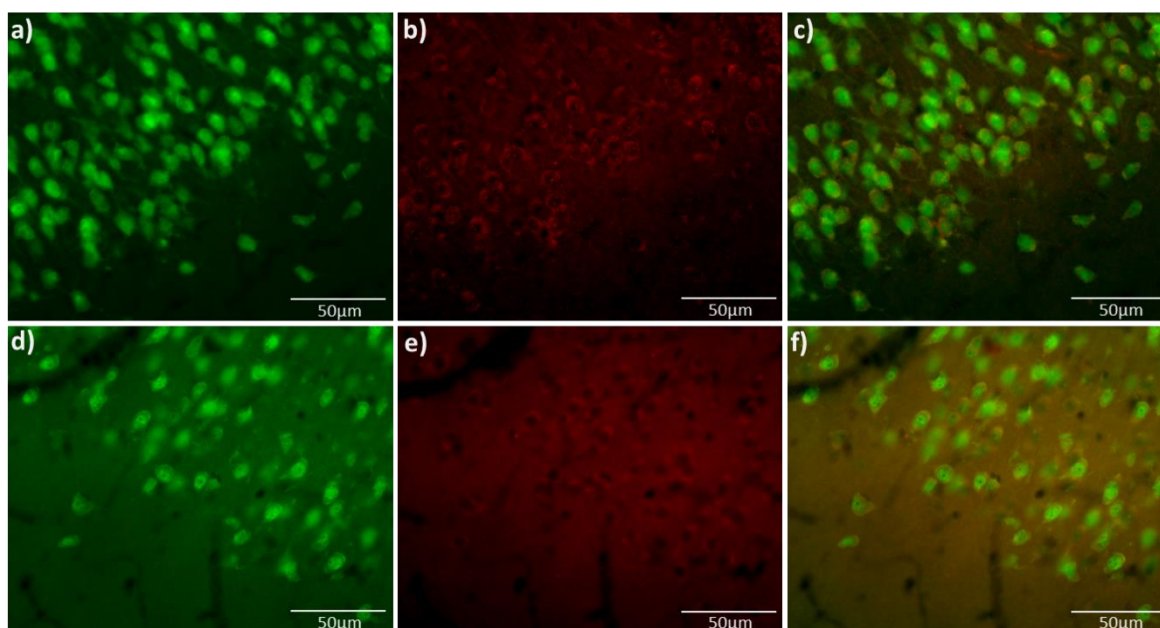


**Figura 45. Efecto de PALI en los marcadores de activación microglial de tipo M2 bajo condiciones de estrés.** Niveles de mRNA y proteicos de Arg1 (a,b) y FOLR2 (c,d) en estrés agudo, niveles de mRNA y proteicos de Arg1 (e,f) y FOLR2 (g,h) en estrés crónico en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=6-7 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C; & p<0.05, && p<0.01 vs P<sub>1</sub> (Veh+PALI); # p<0.05,## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.



Siguiendo en la misma línea, se procedió a evaluar la expresión de los marcadores Arg1 y FOLR2 en cortes de tejido, enfocándonos en la corteza prefrontal, mediante inmunofluorescencia.

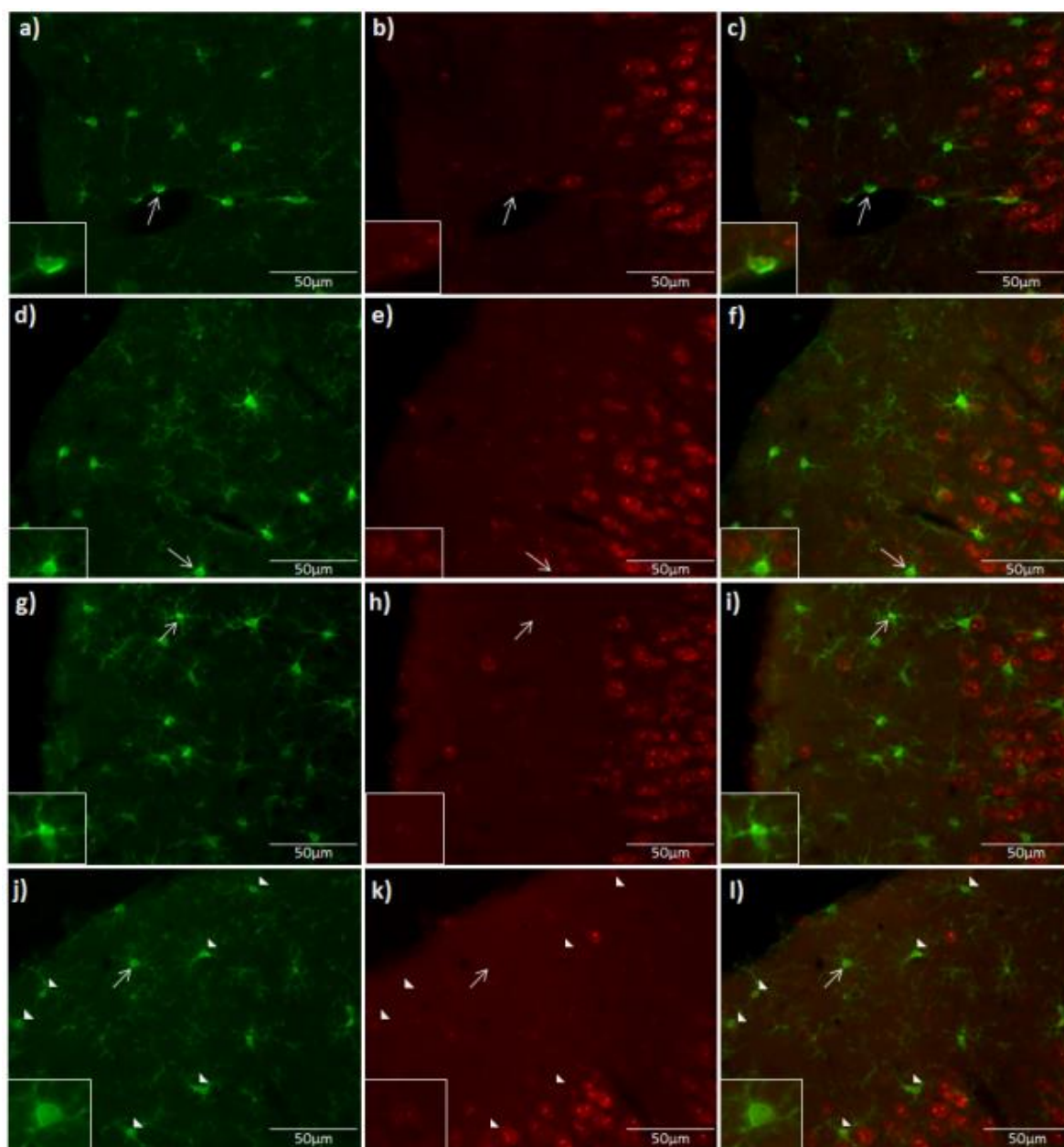
En primer lugar, el tipo celular que mayoritariamente expresa dichos marcadores son las neuronas (Fig.46). Se realizó una inmunofluorescencia doble para Arg1 (Fig.46a-c) y otra para FOLR2 (Fig.46d-f), en donde se identificaron las neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN el cual fue reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, dando una tinción positiva en verde (Fig.46a, d), la tinción positiva para los marcadores M2 se observa en rojo (Fig.46b, e). Al superponer las correspondientes imágenes (Fig.46c, f) se observa que la señal de Arg1 colocaliza con la neuronal (Fig.46c), al igual que la de FOLR2 (Fig.46f), presentando ambas un patrón de tinción citoplasmático.



**Figura 46. Expresión de Marcadores M2 Arg1 y FOLR2 en neuronas.** Secciones de 30μm de corteza prefrontal de ratas control. Las neuronas se marcaron con NeuN en verde (a y d); Arg1 se identificó en rojo (b); FOLR2 también se marcó en rojo (e). Los marcadores M2 colocaliza con las neuronas en las áreas superpuestas que aparecen en amarillo en las imágenes combinadas para Arg1 (c) y FOLR2 (f). Escala de 50 μm.

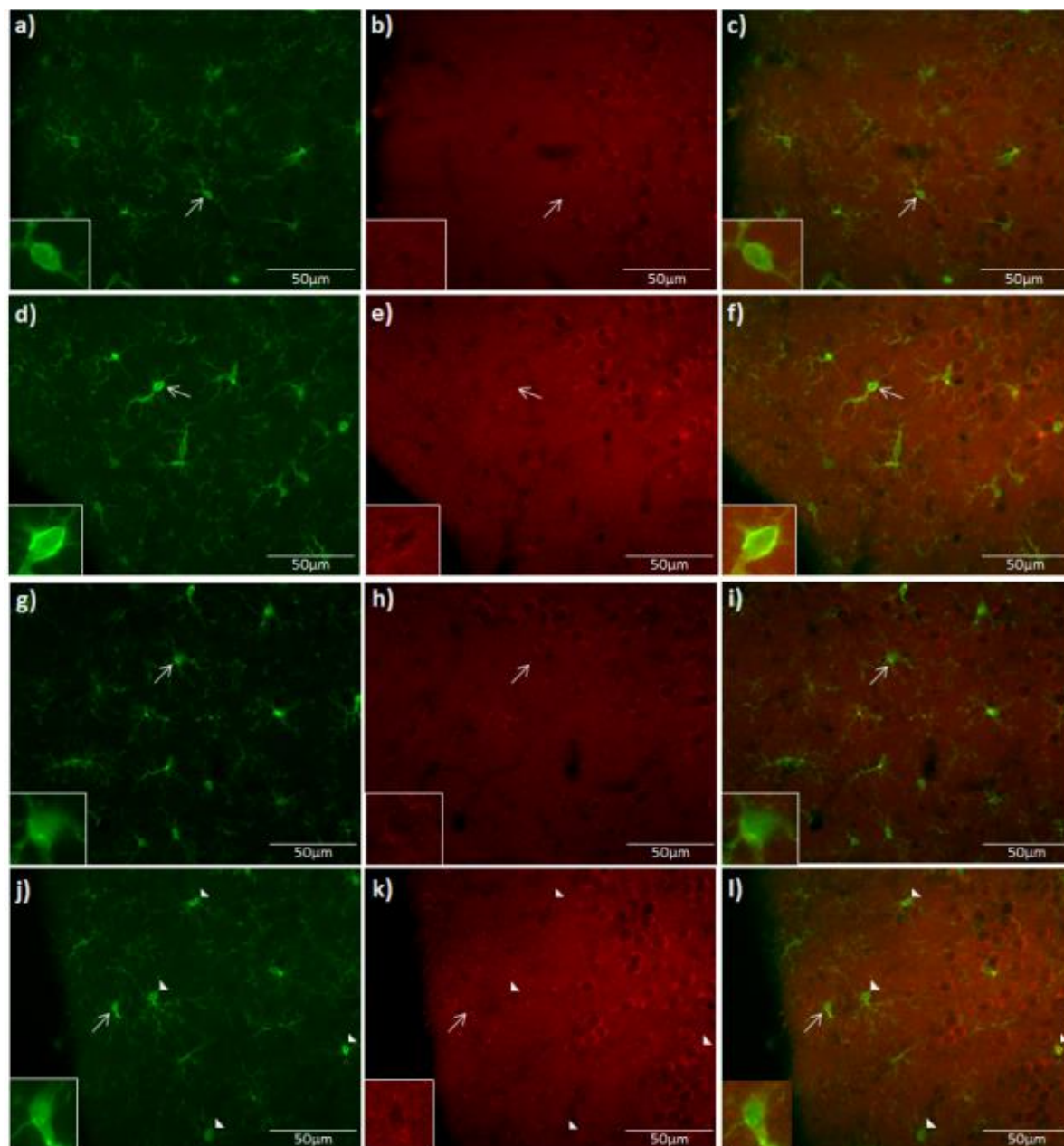
El siguiente paso fue, evaluar la expresión de dichos marcadores en la microglía, para ello se realizaron inmunofluorescencias dobles, donde la microglía se detecta mediante el anticuerpo anti-Iba1, cuyo secundario estaba conjugado con Alexa 488 dando una tinción positiva en verde.

Se detectó inmunoreactividad para Arg1 en microglía (Fig.47), tanto en condiciones de control (Fig.47a-f) como de estrés (Fig.47g-l). Su colocalización indica una distribución citoplásmica. Se observó un aumento en la cantidad de microglía que expresa Arg1 en aquellos animales tratados con Pali y expuestos a estrés agudo (Fig.47j-l).



**Figura 47. Expresión de Arg1 en microglía.** Secciones de 30µm de corteza prefrontal de ratas control (a-c), controles tratadas con PALI (d-f), sometidas a estrés agudo (g-i), y tratadas con PALI y expuestas a estrés agudo (j-l). La microglía se marcó con Iba1 en verde (a, d, g y j); Arg1 se identificó en rojo (b, e, h y k). Arg1 colocaliza con las microglías en las áreas superpuestas indicadas con flechas y amplificadas en la esquina inferior izquierda (c, f, i y l). Escala de 50 µm.

Por otro lado, también se detectó inmunoreactividad para FOLR2 en microglía (Fig.48), tanto en condiciones de control (Fig.48a-f) como de estrés (Fig.48g-l). Se observó un leve aumento en la cantidad de microglía que expresa FOLR2 en aquellos animales estresados que han sido tratados con PALI (Fig.48j-l).

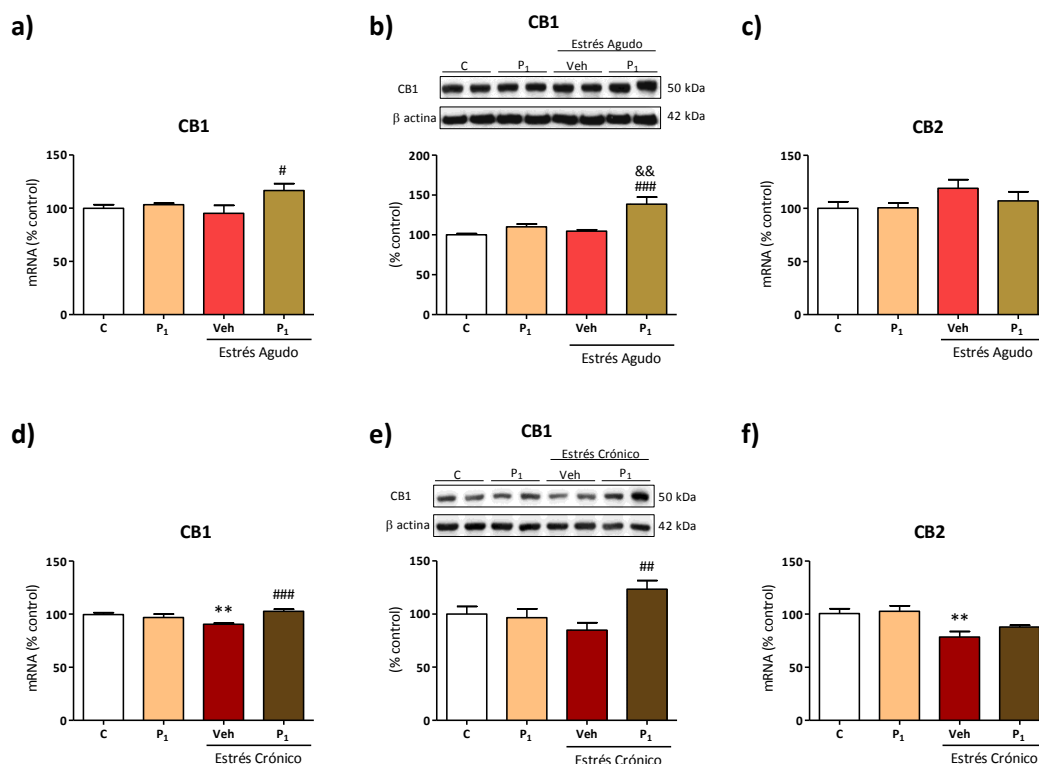


**Figura 48. Expresión de FOLR2 en microglía.** Secciones de 30µm de corteza prefrontal de ratas control (a-c), controles tratadas con PALI (d-f), sometidas a estrés agudo (g-i), y tratadas con PALI y expuestas a estrés agudo (j-l). La microglía se marcó con Iba1 en verde (a, d, g y j); FOLR2 se identificó en rojo (b, e, h y k). FOLR2 colocaliza con las microglías en las áreas superpuestas indicadas con flechas y amplificadas en la esquina inferior izquierda (c, f, i y l). Escala de 50 µm.

## 2.9 EFECTO DE PALIPERIDONA EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Actualmente, los tratamientos usados en los trastornos asociados con la psicosis tienen una eficacia parcial, por lo que es necesario explorar nuevos mecanismos de acción de los antipsicóticos existentes, o en su defecto, encontrar nuevas dianas terapéuticas que ayuden en el tratamiento. Además, diversos estudios han demostrado una estrecha relación entre la desregulación del sistema endocannabinoide y la esquizofrenia. Es por ello que nuestro siguiente objetivo fue evaluar el potencial efecto regulador de la paliperidona en el sistema endocannabinoide en los modelos animales de rata sometido a estrés agudo y crónico por movilidad restringida, tanto a nivel de PFC como a nivel periférico.

En primer lugar se estudió el estado de los receptores que forman parte del sistema endocannabinoide. Bajo las condiciones de estrés agudo no se aprecian cambios en los niveles de los principales receptores CB1 y CB2 (Fig. 49a-c), pero el tratamiento de paliperidona bajo estas mismas condiciones es capaz de inducir un aumento en los niveles de mRNA y proteicos del receptor CB1 (Fig. 49a, b). Por otro lado, bajo condiciones de estrés crónico los niveles de mRNA de ambos receptores disminuyen respecto al grupo control, pero no afectan de manera significativa los niveles proteicos de CB1 (Fig. 49d-f); el tratamiento con paliperidona previene la disminución de los niveles de mRNA inducida por el estrés crónico (Fig. 49d, f), e incluso aumenta de manera significativa la expresión proteica de CB1 en PFC cuando se compara con el grupo sometido a estrés (Fig. 49e).



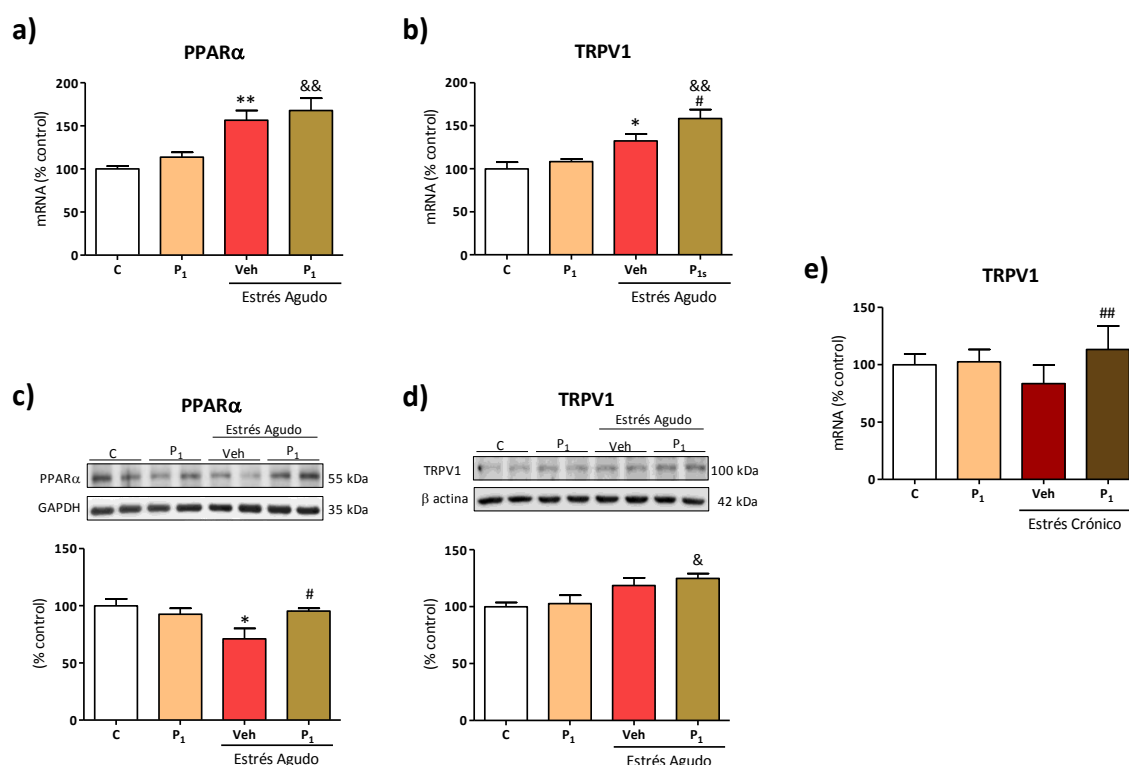
**Figura 49. Efecto de PALI en los receptores clásicos del sistema endocannabinoide en Corteza prefrontal bajo condiciones de estrés.** Niveles de mRNA y proteicos de CB1 (a,b), niveles de mRNA de CB2 (c) en estrés agudo, niveles de mRNA y proteicos de CB1 (d,e), niveles de mRNA de CB2 (f) en estrés crónico en PFC de ratas control (C y P1) y expuestas a estrés (Veh y P1). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM ( $n=5$  en estrés agudo;  $n=5-8$  en estrés crónico). \*\*  $p<0.01$  vs. C; &&  $p<0.01$  vs. P1 (sin estrés); #  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$  vs. Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Posteriormente, se estudió el efecto de paliperidona sobre alguno de los receptores alternativos del sistema endocannabinoide: PPAR $\alpha$ , TRPV1 y GPR55 en corteza prefrontal.

El estrés agudo induce un aumento en los niveles de mRNA de PPAR $\alpha$  y TRPV1 independiente del tratamiento con el antipsicótico (Fig.50a, b). Contrariamente, el estrés agudo induce una disminución en los niveles proteicos de PPAR $\alpha$ , el cual es prevenido por el tratamiento con paliperidona (Fig.50c). De igual manera, paliperidona induce un aumento en los niveles proteicos de TRPV1 bajo condiciones de estrés agudo cuando se compara respecto a su grupo control (P<sub>1</sub> sin estrés) (Fig.50d).

En los animales expuestos a estrés crónico no se apreciaron cambios significativos en los niveles de mRNA ni en los niveles proteicos de PPAR $\alpha$  y TRPV1, a excepción del aumento de los niveles de mRNA de TRPV1 en los animales tratados con paliperidona y expuestos a estrés durante 21 días cuando se compara respecto al grupo que solo se sometió a estrés (Fig.50e).

La expresión proteica de GPR55 no se vio afectada bajo ninguna de las condiciones de estrés y tampoco varió con el tratamiento de paliperidona.



**Figura 50. Efecto de PALI en los receptores alternativos del sistema endocannabinoide en Corteza prefrontal.** Niveles de mRNA (a,b) y proteicos de PPAR $\alpha$  y TRPV1 en estrés agudo (c,d), niveles de mRNA de TRPV1 en estrés crónico (e) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=5-8 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. C; &p<0.05, &&p<0.01 vs Veh+PALI (P<sub>1</sub>, 1mg/kg, sin estrés); # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni

A continuación se estudió el efecto de paliperidona sobre las alteraciones que inducen ambos modelos de estrés en la vía de síntesis y degradación del endocannabinoide AEA en la corteza prefrontal.



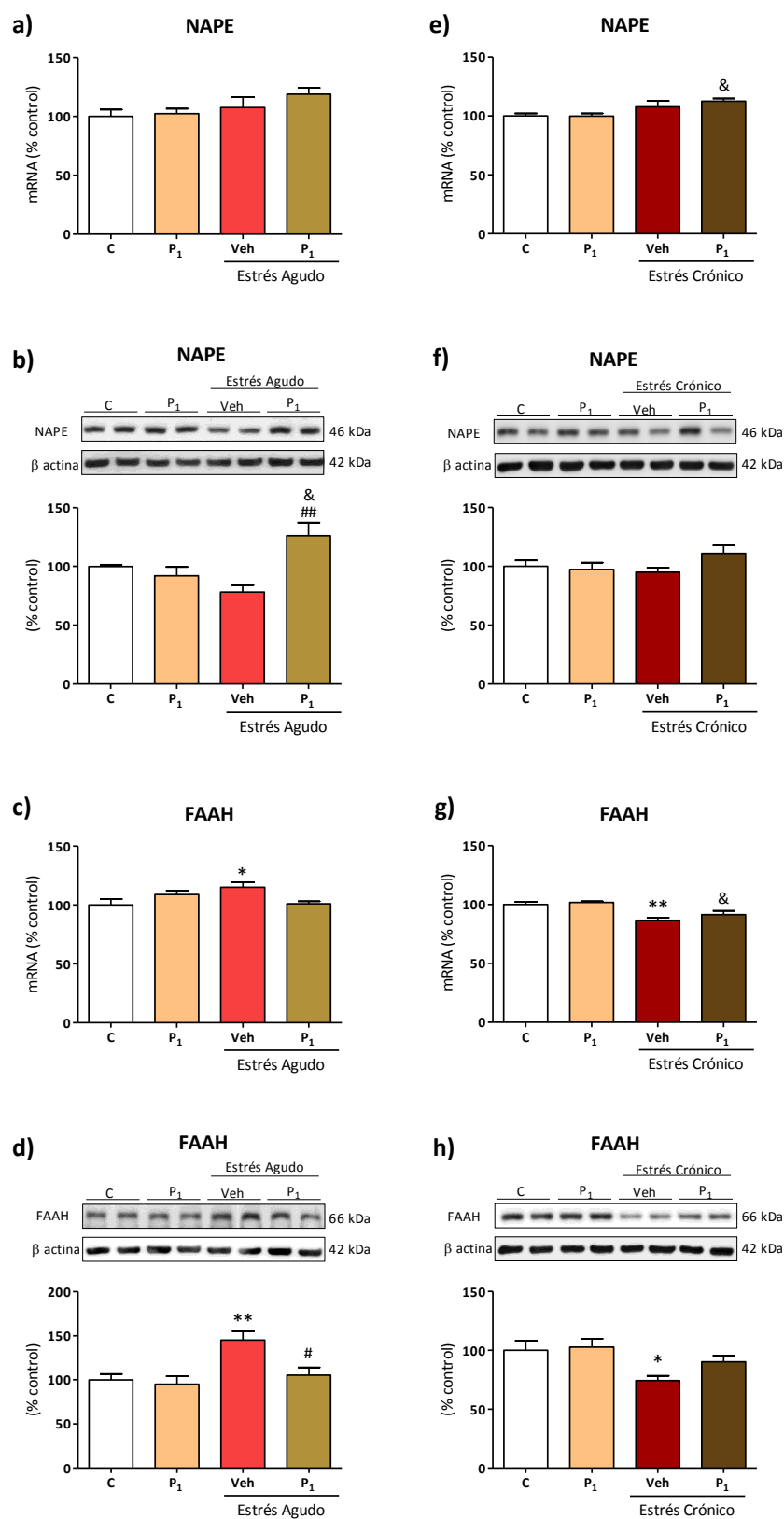
Bajo condiciones de estrés agudo no se aprecian cambios en los niveles de mRNA de la enzima de síntesis NAPE-PLD (Fig.51a), pero sí se observa un aumento en los niveles proteicos de la proteína en los animales estresados que han sido expuestos al tratamiento con el antipsicótico cuando se compara respecto a su grupo control y al grupo que solo se ha sometido a estrés (Fig.51b). Por otro lado, el estrés induce un aumento en los niveles de mRNA de la enzima de degradación, FAAH, cuando se compara respecto al grupo control (Fig.51c). De igual manera, el estrés induce un aumento en los niveles proteicos de FAAH, el cual es prevenido por el tratamiento con paliperidona (Fig.51d).

Respecto a los cambios apreciados bajo condiciones de estrés crónico, se puede observar que paliperidona induce un aumento en los niveles de mRNA de NAPE-PLD cuando se compara respecto su grupo control (Fig.51e), pero que *a posteriori* no se traduce en cambios significativos a nivel proteico (Fig.51f). Además, el estrés crónico induce una disminución de FAAH tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico cuando se compara respecto al grupo control (Fig.51g, h), dichos cambios prevalecen a nivel del mRNA en los animales estresados y tratados con el antipsicótico cuando se compara con su propio control (Fig.51g), pero tienden a la normalidad cuando se evalúan los niveles proteicos de FAAH (Fig.51h).

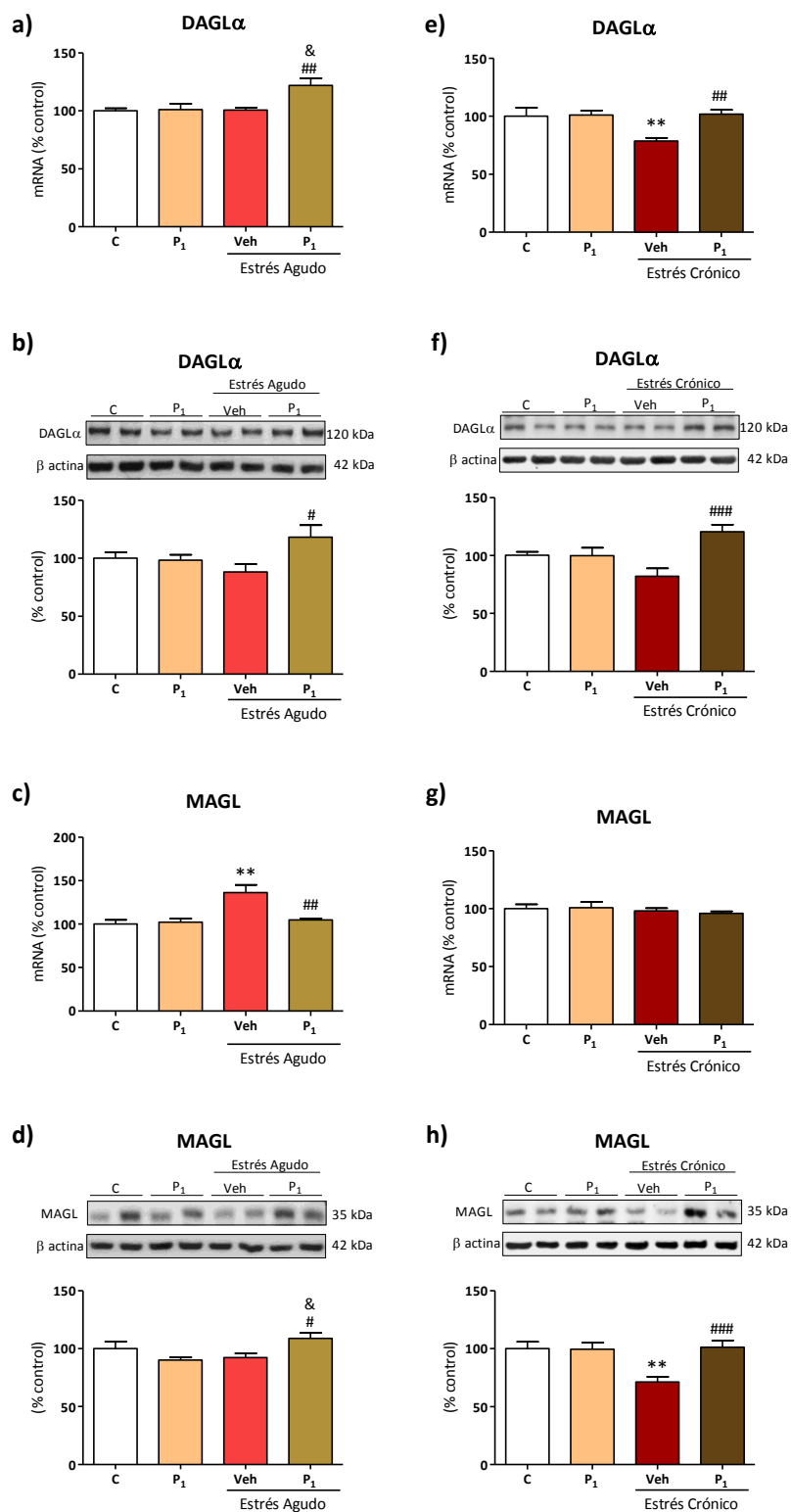
Posteriormente, se analizó el efecto de paliperidona sobre las alteraciones que inducen ambos modelos de estrés en la vía de síntesis y degradación del endocannabinoide 2-AG en la corteza prefrontal.

El estrés agudo no induce cambios en la enzima de síntesis DAGL $\alpha$ , pero si induce un aumento en los niveles de mRNA y proteicos cuando se administra previamente el antipsicótico en comparación con el grupo al que solo se estresa (Fig.52a, b). Por otro lado, el estrés agudo induce un aumento en los niveles de mRNA de la enzima de degradación MAGL, el cual es prevenido cuando se trata con paliperidona previamente (Fig.52c). No obstante, el único cambio observado en MAGL a nivel proteico, es el aumento en los niveles del grupo tratado con paliperidona y sometido a estrés cuando se compara frente al grupo de solo estresados o al grupo control del antipsicótico (Fig.52d).

Bajo condiciones de estrés crónico, se observa una disminución significativa en los niveles de mRNA de DAGL $\alpha$ , que es prevenido por el tratamiento con paliperidona (Fig.52e). De igual manera, paliperidona induce un aumento en los niveles proteicos de la enzima cuando se compara respecto al grupo de animales estresados (Fig.52f). Por otro lado, al analizar la enzima de degradación MAGL, no se observan cambios a nivel del mRNA en ninguno de los grupos estudiados (Fig.52g), pero el estrés repetido induce una disminución significativa en los niveles proteicos de la enzima, el cual es prevenido por el tratamiento con el antipsicótico (Fig.52h).



**Figura 51. Efecto de PALI en el metabolismo de AEA bajo condiciones de estrés en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA y proteicos de NAPE-PLD y FAAH en estrés agudo (a-d), niveles de mRNA y proteicos de NAPE-PLD y FAAH en estrés crónico (e-f) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=5 en estrés agudo; n=5-8 en estrés crónico). \*p<0.05, \*\* p<0.01 vs. C; & p<0.05 vs Veh+PALI (P<sub>1</sub>, 1mg/kg, sin estrés); # p<0.05, ## p<0.01 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni



**Figura 52. Efecto de PALI en el metabolismo de 2-AG bajo condiciones de estrés en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA y proteicos de DAGLα y MAGL en estrés agudo (a-d), niveles de mRNA y proteicos de DAGLα y MAGL en estrés crónico (e-f) en corteza prefrontal de ratas control (C y P<sub>1</sub>) y expuestas a estrés (Veh y P<sub>1</sub>). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=5 en estrés agudo; n=5-8 en estrés crónico). \*\* p<0.01 vs. C; &p<0.05 vs Veh+PALI (P<sub>1</sub>, 1mg/kg, sin estrés); # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+Estrés. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.



Por último, con la finalidad de determinar los posibles efectos sistémicos de paliperidona en los diversos componentes del sistema endocannabinoide, se evaluó el efecto del antipsicótico sobre los PBMC de los animales sometidos tanto a estrés agudo como a estrés crónico.

Las diferencias encontradas en ambos modelos de estrés se relacionan con el metabolismo de 2-AG. El estrés agudo induce una disminución en los niveles proteicos de la enzima de síntesis DAGL $\alpha$  y un aumento en la de degradación MAGL, reflejando una posible disminución del endocannabinoide 2-AG en la periferia. Sin embargo, estos cambios fueron prevenidos por la administración de paliperidona en el caso de DAGL $\alpha$ . Contrariamente, el modelo de estrés crónico induce un aumento significativo en los niveles de la proteína de síntesis DAGL $\alpha$ , y dicho efecto es potenciado por el tratamiento diario con el antipsicótico (Tabla 11).

Parámetro	Valor Control	% Veh	% PALI	
		Estrés		
CB2	0.562±0.04	117.8±4.09	115.8±7.21	Estrés Agudo
NAPE	0.712±0.03	119.7±16.14	115.2±10.06	
FAAH	0.338±0.03	121.7±13.65	100.1±10.99	
DAGLα	0.404±0.01	68.65.2±4.9**	102.3±4.54 <sup>##</sup>	
MAGL	0.614±0.03	128.8.9±6.67*	110.3±6.78	
CB2	0.580±0.04	85.29±5.83	98.7±6.45	Estrés Crónico
NAPE	0.536±0.04	93.61±7.98	104.0±11.34	
FAAH	0.572±0.07	109.8±14.5	102.2±6.9	
DAGLα	0.320±0.02	140.7±6.07*	185.9±6.71 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	
MAGL	0.401±0.01	120.3±7.29	108.4±9.14	

**Tabla 11. Efectos de Paliperidona en el sistema endocannabinoide a nivel periférico en PBMC.** Niveles proteicos de CB2, NAPE, FAAH, DAGL $\alpha$  y MAGL en porcentaje de los grupos estresados respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test Bonferroni \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs. Control; &&& p<0.001 vs. Veh+PALI; ## p<0.01 vs. Veh+Estrés Agudo/Crónico.

## 2.10 RESUMEN DE RESULTADOS:

Los resultados derivados del segundo bloque de experimentos, se sintetizan en la tabla resumen 2 y 3 para los del modelo de estrés agudo, y en la tabla resumen 4 y 5 para los del modelo crónico.

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Estrés	Tratamiento	Interacción
mRNA TNFα (AU)	0.93±0.02	129.0±3.7***	109.1±4.3 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =21.36	F <sub>(1,12)</sub> =6.03	F <sub>(1,12)</sub> =5.19
mRNA IL1β (AU)	0.95±0.02	137.1±8.0**	93.07±5.4 <sup>###</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =7.92	F <sub>(1,12)</sub> =16.38	F <sub>(1,12)</sub> =14.42
TNFα (pg/mg prot)	123.1±10.8	148.6±11.7**	117.0±9.5 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =10.24	F <sub>(1,12)</sub> =1.98	F <sub>(1,12)</sub> =3.74
IL1β (pg/mg prot)	515.7±44	125.5±11.9*	101.2±3.2 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =5.36	F <sub>(1,12)</sub> =4.56	F <sub>(1,12)</sub> =2.35
mRNA NFκB (AU)	1.01±0.03	124.2±3.7**	95.92±3.5 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =4.4	F <sub>(1,12)</sub> =9.09	F <sub>(1,12)</sub> =11.18
mRNA IκBα (AU)	1.08±0.04	191.9±21***	177.8±9.5 <sup>&amp;&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =45.32	F <sub>(1,12)</sub> =0.18	F <sub>(1,12)</sub> =0.51
mRNA iNOS (AU)	0.70±0.07	125.9 ±4.1***	103.6±2.7 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =15.2	F <sub>(1,12)</sub> =8.9	F <sub>(1,12)</sub> =7.9
mRNA COX-2 (AU)	0.91±0.03	109.9±1.7	94.92±6.0	F <sub>(1,12)</sub> =0.67	F <sub>(1,12)</sub> =3.59	F <sub>(1,12)</sub> =1.67
mRNA mPGES-1 (AU)	0.96±0.03	144.6±10.6***	115.4±2.2 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =25.17	F <sub>(1,12)</sub> =6.01	F <sub>(1,12)</sub> =5.88
WB NFκB (AU)	0.86±0.03	155.1±10.6***	123.0±6.4 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =24.24	F <sub>(1,12)</sub> =3.25	F <sub>(1,12)</sub> =6.47
WB IκBα (AU)	0.90±0.06	90.4±4.9	124.9±7.9 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.88	F <sub>(1,12)</sub> =6.48	F <sub>(1,12)</sub> =5.15
WB iNOS (AU)	1.11±0.14	166.2±22.3**	106.2±4.5 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =6.67	F <sub>(1,12)</sub> =4.49	F <sub>(1,12)</sub> =5.46
WB COX-2 (AU)	0.50±0.02	155.8±20.7*	118.1±7.2 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =9.28	F <sub>(1,12)</sub> =2.2	F <sub>(1,12)</sub> =3.19
PGE2 (pg/mg prot)	76.6±5.05	170.9±14.9*	116.6±20.6 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =7.23	F <sub>(1,12)</sub> =2.45	F <sub>(1,12)</sub> =4.46
MDA (nmol/mg prot)	0.18±0.004	141.0±11.4**	116.7±5.8 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =15.12	F <sub>(1,12)</sub> =2.5	F <sub>(1,12)</sub> =3.24
Nitritos (μM/mg prot)	1.57±0.1	145.7±6.0**	95.8±9.9 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =7.74	F <sub>(1,12)</sub> =10.92	F <sub>(1,12)</sub> =9.12
mRNA TLR4 (AU)	0.86 ± 0.05	143.3±5.7***	112.1±3.6 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =26.82	F <sub>(1,12)</sub> =8.65	F <sub>(1,12)</sub> =7.91
mRNA MD2 (AU)	0.98 ± 0.02	136.9±11.5**	115.2±5.7	F <sub>(1,12)</sub> =7.07	F <sub>(1,12)</sub> =0.38	F <sub>(1,12)</sub> =5.32
mRNA MyD88 (AU)	1.01 ± 0.04	133.0±1.6***	120.6±3.1 <sup>&amp;#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =48.57	F <sub>(1,12)</sub> =1.58	F <sub>(1,12)</sub> =4.75
WB TLR4 (AU)	1.01±0.02	126.1±2.9*	107.8±10.0 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.49	F <sub>(1,12)</sub> =0.49	F <sub>(1,12)</sub> =16.04
WB MD2 (AU)	0.38±0.05	149.1±10.2*	118.3±10.3	F <sub>(1,12)</sub> =8.76	F <sub>(1,12)</sub> =1.84	F <sub>(1,12)</sub> =1.81
WB MyD88 (AU)	1.11±0.04	143.3±6.3**	90.3±11.1 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =4.16	F <sub>(1,12)</sub> =12.00	F <sub>(1,12)</sub> =19.24
mRNA HSP60 (AU)	0.99±0.1	109.3±10.1	111.4±4.7	F <sub>(1,12)</sub> =1.89	F <sub>(1,12)</sub> =0.16	F <sub>(1,12)</sub> =0.01
mRNA HSP70 (AU)	0.94±0.08	149.1±8.4**	131.4±9.9	F <sub>(1,12)</sub> =23.15	F <sub>(1,12)</sub> =0.76	F <sub>(1,12)</sub> =1.78
mRNA HMGB1 (AU)	1.07±0.1	127.5±4.4***	118.0±3.6	F <sub>(1,12)</sub> =28.33	F <sub>(1,12)</sub> =0.25	F <sub>(1,12)</sub> =4.20
WB HSP60 (AU)	0.91±0.04	122.0±6.1	120.0±9.1	F <sub>(1,12)</sub> =6.30	F <sub>(1,12)</sub> =0.03	F <sub>(1,12)</sub> =0.19
WB HSP70 (AU)	0.88±0.03	153.5±18.0*	102.7±12.2 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =5.16	F <sub>(1,12)</sub> =4.18	F <sub>(1,12)</sub> =4.76
WB HMGB1 (AU)	0.89±0.03	147.1±12.9**	119.7±4.7 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =16.48	F <sub>(1,12)</sub> =2.05	F <sub>(1,12)</sub> =4.84
mRNA IL6 (AU)	0.93±0.05	145.1±11.4**	120.0±8.5 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =15.59	F <sub>(1,12)</sub> =2.04	F <sub>(1,12)</sub> =3.06
mRNA IFNγ (AU)	1.06±.03	123.4±5.9**	98.5±3.1 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =9.40	F <sub>(1,12)</sub> =11.87	F <sub>(1,12)</sub> =10.49
mRNA IL4 (AU)	0.68±0.05	156.5±10.1***	100.9±3.6 <sup>###</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =13.97	F <sub>(1,12)</sub> =13.05	F <sub>(1,12)</sub> =16.82
mRNA TGFβ (AU)	0.71±0.06	90.6±2.9	108.3±5.0 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.01	F <sub>(1,12)</sub> =4.74	F <sub>(1,12)</sub> =4.87
mRNA CX3CL1 (AU)	1.00±0.07	79.0±7.5**	92.2±3.2	F <sub>(1,12)</sub> =9.94	F <sub>(1,12)</sub> =1.82	F <sub>(1,12)</sub> =3.02
mRNA IL10 (AU)	0.95±0.02	66.6±6.1***	95.8±3.6 <sup>###</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =20.57	F <sub>(1,12)</sub> =12.44	F <sub>(1,12)</sub> =12.42
IL10 (pg/mg prot)	1119±55	82.3±4.3	100.2±2.2	F <sub>(1,12)</sub> =2.21	F <sub>(1,12)</sub> =2.31	F <sub>(1,12)</sub> =2.01
mRNA ArgI (AU)	1.01±0.1	109.0±5.0	133.7±5.6 <sup>&amp;#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> = 7.63	F <sub>(1,12)</sub> = 7.42	F <sub>(1,12)</sub> = 1.67
mRNA FOLR2 (AU)	0.90±0.04	124.8±3.7**	123.1±2.7 <sup>&amp;&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =45.18	F <sub>(1,12)</sub> =0.29	F <sub>(1,12)</sub> =0.01
WB ArgI (AU)	0.46±0.03	79.5±7.9	110.0±9.3 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.53	F <sub>(1,12)</sub> =4.74	F <sub>(1,12)</sub> =5.04
WB FOLR2 (AU)	1.00±0.01	98.3±2.2	116.8±6.3 <sup>&amp;#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =4.66	F <sub>(1,12)</sub> =3.80	F <sub>(1,12)</sub> =6.57

**Tabla Resumen 2. Resultados de los efectos de PALI en corteza prefrontal en un modelo neuroinflamatorio agudo inducido por estrés.** Expresión proteica y niveles de mRNA de diversos parámetros proinflamatorios y antiinflamatorios expresados en porcentaje, de los grupos tratados con antipsicóticos y expuestos a LPS con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, o según se indique). AU, unidades arbitrarias. Test estadístico ANOVA de dos vías \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05, && p<0.01 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Estrés agudo

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Estrés	Tratamiento	Interacción
mRNA PI3K (AU)	1.06±0.06	112.8±3.50	119.7±2.69 <sup>&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =15.81	F <sub>(1,12)</sub> =2.09	F <sub>(1,12)</sub> =0.29
mRNA AKT (AU)	0.98±0.01	119.1±4.41**	127.5±4.15 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =39.33	F <sub>(1,12)</sub> =2.18	F <sub>(1,12)</sub> =0.79
mRNA KEAP1 (AU)	1.19 ±0.06	114.9±3.74	128.9±5.89 <sup>&amp;&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =16.76	F <sub>(1,12)</sub> =3.18	F <sub>(1,12)</sub> =1.15
mRNA NRF2 (AU)	0.97 ±0.05	105.4±3.75	99.97±8.12	F <sub>(1,12)</sub> =0.14	F <sub>(1,12)</sub> =0.14	F <sub>(1,12)</sub> =0.53
WB PI3K (AU)	0.69±0.06	106.9±6.0	136.0±8.0 <sup>&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =6.77	F <sub>(1,12)</sub> =3.5	F <sub>(1,12)</sub> =3.02
Ratio AKT (AU)	1.009±0.05	1.30±0.02*	1.21±0.03	F <sub>(1,12)</sub> =14.65	F <sub>(1,12)</sub> =0.68	F <sub>(1,12)</sub> =0.23
WB KEAP1 (AU)	0.48±0.03	133.4±5.4**	105.0±4.2 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =7.95	F <sub>(1,12)</sub> =4.13	F <sub>(1,12)</sub> =6.07
WB NRF2 (AU)	1.21±0.07	82.6±13.9	126.8±8.5 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.14	F <sub>(1,12)</sub> =6.72	F <sub>(1,12)</sub> =5.21
mRNA HO1 (AU)	0.91±0.07	107.1±7.8	111.3±6.3	F <sub>(1,12)</sub> =1.45	F <sub>(1,12)</sub> =0.16	F <sub>(1,12)</sub> =0.04
mRNA NQO1 (AU)	0.96±0.04	114.7±4.6	135.1±9.6 <sup>&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =11.76	F <sub>(1,12)</sub> =2.33	F <sub>(1,12)</sub> =1.84
mRNA SOD (AU)	1.01±0.008	100.6±4.0	115.4±0.6 <sup>&amp;##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =4.34	F <sub>(1,12)</sub> =10.08	F <sub>(1,12)</sub> =3.54
mRNA GPx (AU)	0.92±0.06	99.87±5.9	125.5±6.0 <sup>&amp;##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =3.45	F <sub>(1,12)</sub> =14.66	F <sub>(1,12)</sub> =3.54
mRNA CAT (AU)	0.99±0.07	98.0±6.2	111.7±9.2 <sup>&amp;#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =3.63	F <sub>(1,12)</sub> =8.58	F <sub>(1,12)</sub> =5.59
mRNA L-PGDS (AU)	0.77±0.1	106.5±7.1	147.9±12.2 <sup>&amp;&amp;##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =9.61	F <sub>(1,12)</sub> =6.54	F <sub>(1,12)</sub> =5.44
WB L-PGDS (AU)	0.86±0.07	81.5±4.7	116.3±6.9 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.01	F <sub>(1,12)</sub> =5.84	F <sub>(1,12)</sub> =6.39
15d-PGJ2 (pg/mg prot)	6.13±0.7	94.1±14.6	120.4±22.7	F <sub>(1,12)</sub> =0.09	F <sub>(1,12)</sub> =0.91	F <sub>(1,12)</sub> =0.45
mRNA PPARγ (AU)	0.92±0.08	85.3±3.4	113.1±4.4 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.03	F <sub>(1,12)</sub> =9.34	F <sub>(1,12)</sub> =9.35
WB PPARγ (AU)	0.86±0.02	92.3±3.9	120.0±1.5 <sup>&amp;##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =1.05	F <sub>(1,12)</sub> =13.05	F <sub>(1,12)</sub> =7.88
Act PPARγ (AU)	0.31±0.01	0.2±0.02**	0.3±0.02 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =6.05	F <sub>(1,12)</sub> =2.78	F <sub>(1,12)</sub> =7.05
mRNA CB1 (AU)	0.83±0.05	95.3±7.3	116.7±6.5 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =1.06	F <sub>(1,12)</sub> =7.10	F <sub>(1,12)</sub> =3.91
WB CB1 (AU)	0.73±0.01	104.6±1.8	138.5±9.0 <sup>&amp;&amp;###</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =10.8	F <sub>(1,12)</sub> =19.53	F <sub>(1,12)</sub> =5.67
mRNA CB2 (AU)	0.88±0.05	118.9±8.1	107.2±8.5	F <sub>(1,12)</sub> =3.27	F <sub>(1,12)</sub> =0.62	F <sub>(1,12)</sub> =0.75
mRNA PPARα (AU)	1.09±0.03	156.6±11.4**	167.8±14.1 <sup>&amp;&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =32.76	F <sub>(1,12)</sub> =1.66	F <sub>(1,12)</sub> =0.02
mRNA TRPV1 (AU)	0.97±0.09	132.5±7.8*	158.4±10.3 <sup>&amp;&amp;#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =28.8	F <sub>(1,12)</sub> =4.91	F <sub>(1,12)</sub> =1.32
WB PPARα (AU)	0.64±0.03	71.0±9.1*	95.4±2.4 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =4.33	F <sub>(1,12)</sub> =1.84	F <sub>(1,12)</sub> =6.51
WB TRPV1 (AU)	0.30±0.01	118.5±6.6	124.8±4.2 <sup>&amp;</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =12.6	F <sub>(1,12)</sub> =0.61	F <sub>(1,12)</sub> =0.10
mRNA NAPE (AU)	1.09±0.06	107.6±8.7	118.9±5.2	F <sub>(1,12)</sub> =3.78	F <sub>(1,12)</sub> =1.20	F <sub>(1,12)</sub> =0.52
mRNA FAAH (AU)	0.97±0.04	114.9±4.4*	100.9±2.2	F <sub>(1,12)</sub> =0.81	F <sub>(1,12)</sub> =0.43	F <sub>(1,12)</sub> =8.65
mRNA DAGLα (AU)	1.00±0.02	100.7±2.1	122.1±6.2 <sup>&amp;##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =6.25	F <sub>(1,12)</sub> =6.71	F <sub>(1,12)</sub> =5.47
mRNA MAGL (AU)	1.03±0.05	136.2±8.7**	104.7±1.4 <sup>##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =12.42	F <sub>(1,12)</sub> =7.13	F <sub>(1,12)</sub> =9.41
WB NAPE (AU)	0.96±0.01	78.1±6.0	126.0±11.2 <sup>&amp;##</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.67	F <sub>(1,12)</sub> =7.17	F <sub>(1,12)</sub> =14.04
WB FAAH (AU)	0.87±0.05	145.1±9.9**	105.4±8.6 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =10.2	F <sub>(1,12)</sub> =6.66	F <sub>(1,12)</sub> =4.04
WB DAGLα (AU)	0.93±0.04	88.2±6.8	118.3±10.3 <sup>#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =0.33	F <sub>(1,12)</sub> =3.91	F <sub>(1,12)</sub> =4.90
WB MAGL (AU)	1.09±0.06	92.2±3.6	108.8±4.8 <sup>&amp;#</sup>	F <sub>(1,12)</sub> =1.52	F <sub>(1,12)</sub> =0.54	F <sub>(1,12)</sub> =8.72

Continuación Tabla Resumen 2. Resultados de los efectos de PALI en corteza prefrontal en un modelo neuroinflamatorio agudo inducido por estrés. Expresión proteica y niveles de mRNA de diversos parámetros proinflamatorios y antiinflamatorios expresados en porcentaje, de los grupos tratados con antipsicóticos y expuestos a LPS con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, o según se indique). AU, unidades arbitrarias. Test estadístico ANOVA de dos vías \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05, && p<0.01, &&& p<0.001 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Estrés agudo

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Estrés	Tratamiento	Interacción
<b>PBMC</b>						
WB iNOS (AU)	0.146±0.01	144.3±14.4	127.2±19.6	$F_{(1,12)}=7.8$	$F_{(1,12)}=0.53$	$F_{(1,12)}=0.33$
WB COX-2 (AU)	0.408±0.03	<b>149.2±15.9**</b>	<b>100.2±2.6##</b>	$F_{(1,12)}=5.6$	<b><math>F_{(1,12)}=5.5</math></b>	<b><math>F_{(1,12)}=6.8</math></b>
WB mPGES-1 (AU)	0.508±0.02	115.1±10.1	<b>83.7±3.7#</b>	$F_{(1,12)}=0.27$	<b><math>F_{(1,12)}=8.72</math></b>	$F_{(1,12)}=3.01$
WB PPAR $\gamma$ (AU)	0.373±0.03	113.2±3.9	142.1±21.3	$F_{(1,12)}=2.47$	$F_{(1,12)}=2.04$	$F_{(1,12)}=0.4$
WB CB2 (AU)	0.562±0.04	117.8±4.09	115.8±7.21	<b><math>F_{(1,12)}=6.5</math></b>	$F_{(1,12)}=0.02$	$F_{(1,12)}=0.25$
WB NAPE (AU)	0.712±0.03	119.7±16.14	115.2±10.06	$F_{(1,12)}=3.1$	$F_{(1,12)}=0.09$	$F_{(1,12)}=0.02$
WB FAAH (AU)	0.338±0.03	121.7±13.65	100.1±10.99	$F_{(1,12)}=1.4$	$F_{(1,12)}=1.37$	$F_{(1,12)}=0.67$
WB DAGL $\alpha$ (AU)	0.404±0.01	<b>68.65±4.9**</b>	<b>102.3±4.54##</b>	<b><math>F_{(1,12)}=5.3</math></b>	<b><math>F_{(1,12)}=7.2</math></b>	<b><math>F_{(1,12)}=8.35</math></b>
WB MAGL (AU)	0.614±0.03	<b>128.8.9±6.67*</b>	110.3±6.78	$F_{(1,12)}=2.1$	<b><math>F_{(1,12)}=8.95</math></b>	$F_{(1,12)}=1.69$
<b>Plasma</b>						
NO $_2$ ( $\mu$ M/ml plasma)	17.44±1.26	118.9±4.2	<b>87.7±9.4#</b>	$F_{(1,12)}=0.04$	$F_{(1,12)}=4.14$	<b><math>F_{(1,12)}=6.97</math></b>
LPS (AU)	0.95±0.1	<b>194.1±26.9**</b>	<b>130.8±18.7#</b>	<b><math>F_{(1,12)}=12.04</math></b>	$F_{(1,12)}=2.92$	$F_{(1,12)}=3.65$
IL10 (pg/ml plasma)	397±45	65.9±8.9	<b>162.8±10.8&amp;###</b>	$F_{(1,12)}=1.07$	<b><math>F_{(1,12)}=11.71</math></b>	<b><math>F_{(1,12)}=11.92</math></b>
<b>Colon</b>						
WB iNOS (AU)	0.14±0.009	<b>171.4±14.1***</b>	<b>108.1±4.3###</b>	<b><math>F_{(1,12)}=17.15</math></b>	<b><math>F_{(1,12)}=10.14</math></b>	<b><math>F_{(1,12)}=17.92</math></b>
WB COX-2 (AU)	0.47±0.05	<b>134.6±8.3*</b>	115.5±8.4	<b><math>F_{(1,12)}=9.67</math></b>	$F_{(1,12)}=1.78$	$F_{(1,12)}=0.72$
WB CCL28 (AU)	0.72±0.04	122.6±10.3	105.6±7.4	$F_{(1,12)}=2.78$	$F_{(1,12)}=0.88$	$F_{(1,12)}=1.61$
IgA (ng/mg prot.)	13.39±0.5	82.8±10.4	90.3±17.7	$F_{(1,12)}=1.24$	$F_{(1,12)}=0.14$	$F_{(1,12)}=0.04$

**Tabla Resumen 3. Resultados de los efectos de PALI en periferia en un modelo neuroinflamatorio agudo inducido por estrés.** Expresión proteica y niveles de mRNA de los diversos parámetros estudiados, expresados en porcentaje, de los grupos tratados con paliperidona y expuestos a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. Control; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$  vs. Veh+Estrés agudo

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Estrés	Tratamiento	Interacción
<b>PBMC</b>						
WB iNOS (AU)	0.832±0.10	120.6±11.4	102.6±8.3	$F_{(1,20)}=1.42$	$F_{(1,20)}=0.86$	$F_{(1,20)}=0.81$
WB COX-2 (AU)	0.573±0.02	<b>116.1±2.48*</b>	<b>102.6±4.05#</b>	$F_{(1,20)}=4.29$	$F_{(1,20)}=1.88$	<b><math>F_{(1,20)}=5.17</math></b>
WB mPGES-1 (AU)	0.492±0.04	117.7±9.70	99.7±10.5	$F_{(1,20)}=0.43$	$F_{(1,20)}=0.47$	$F_{(1,20)}=1.48$
WB PPAR $\gamma$ (AU)	0.612±0.09	70.61±10.68	105.4±19.01	$F_{(1,20)}=0.59$	$F_{(1,20)}=1.30$	$F_{(1,20)}=2.07$
WB CB2 (AU)	0.580±0.04	85.29±5.83	98.7±6.45	$F_{(1,20)}=2.07$	$F_{(1,20)}=1.50$	$F_{(1,20)}=0.96$
WB NAPE (AU)	0.536±0.04	93.61±7.98	104.0±11.34	$F_{(1,20)}=0.06$	$F_{(1,20)}=0.40$	$F_{(1,20)}=0.12$
WB FAAH (AU)	0.572±0.07	109.8±14.5	102.2±6.9	$F_{(1,20)}=0.07$	$F_{(1,20)}=0.00$	$F_{(1,20)}=0.46$
WB DAGL $\alpha$ (AU)	0.320±0.02	<b>140.7±6.07**</b>	<b>185.9±6.71&amp;&amp;&amp;</b>	<b><math>F_{(1,20)}=21.88</math></b>	$F_{(1,20)}=3.41$	$F_{(1,20)}=2.51$
WB MAGL (AU)	0.401±0.01	120.3±7.29	108.4±9.14	$F_{(1,20)}=3.36$	$F_{(1,20)}=0.63$	$F_{(1,20)}=0.46$
<b>Plasma</b>						
NO $_2$ ( $\mu$ M/ml plasma)	14.22±0.87	<b>119.8±13.82*</b>	<b>86.95±7.42#</b>	$F_{(1,20)}=1.18$	$F_{(1,20)}=0.07$	<b><math>F_{(1,20)}=9.80</math></b>
LPS (AU)	0.42±0.02	<b>241.0±53.7**</b>	<b>132.5±17.9#</b>	<b><math>F_{(1,20)}=6.04</math></b>	$F_{(1,20)}=2.07$	$F_{(1,20)}=3.89$
IL10(pg/ml plasma)	480±43	77.8±17.7	<b>208.7±45.7##</b>	$F_{(1,20)}=1.59$	<b><math>F_{(1,20)}=4.74</math></b>	$F_{(1,20)}=3.85$
<b>Colon</b>						
WB iNOS (AU)	0.46±0.03	<b>133.9±5.3**</b>	112.6±7.7	<b><math>F_{(1,22)}=6.56</math></b>	$F_{(1,22)}=0.52$	<b><math>F_{(1,22)}=4.68</math></b>
WB COX-2 (AU)	0.90±0.04	94.5±14.0	104.3±7.5	$F_{(1,22)}=0.02$	$F_{(1,22)}=0.34$	$F_{(1,22)}=0.16$
WB CCL28 (AU)	0.54±0.03	<b>134.3±9.9**</b>	119.2±6.5	<b><math>F_{(1,22)}=9.78</math></b>	$F_{(1,22)}=0.42$	$F_{(1,22)}=1.73$
IgA (ng/mg prot.)	27.0±3.4	<b>49.8±7.07*</b>	67.1±11.3	<b><math>F_{(1,22)}=10.33</math></b>	$F_{(1,22)}=0.19$	$F_{(1,22)}=1.05$

**Tabla Resumen 4. Resultados de los efectos de PALI en periferia en un modelo neuroinflamatorio crónico inducido por estrés.** Expresión proteica y niveles de mRNA de los diversos parámetros estudiados, expresados en porcentaje, de los grupos tratados con paliperidona y expuestos a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. Control; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$  vs. Veh+Estrés crónico.

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Estrés	Tratamiento	Interacción
mRNA TNF $\alpha$ (AU)	1.02 $\pm$ 0.03	112.7 $\pm$ 6.6	99.36 $\pm$ 2.5	F <sub>(1,22)</sub> =0.81	F <sub>(1,22)</sub> =1.09	F <sub>(1,22)</sub> =3.58
mRNA IL1 $\beta$ (AU)	1.06 $\pm$ 0.09	109.4 $\pm$ 7.1	93.23 $\pm$ 4.3	F <sub>(1,22)</sub> =0.00	F <sub>(1,22)</sub> =1.54	F <sub>(1,22)</sub> =3.05
TNF $\alpha$ (pg/mg prot)	127.3 $\pm$ 2.25	<b>127.6<math>\pm</math>3.5**</b>	<b>101.6<math>\pm</math>6.7<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=10.04</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.07</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.00</b>
IL1 $\beta$ (pg/mg prot)	566 $\pm$ 15	<b>128.4<math>\pm</math>7.2**</b>	<b>104.9<math>\pm</math>5.6<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.29</b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.30	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.05</b>
mRNA NF $\kappa$ B (AU)	0.70 $\pm$ 0.05	<b>111.7<math>\pm</math>3.7*</b>	<b>94.77<math>\pm</math>2.3<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.04	<b>F<sub>(1,22)</sub>=10.64</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.14</b>
mRNA I $\kappa$ B $\alpha$ (AU)	0.96 $\pm$ 0.04	<b>120.8<math>\pm</math>5.9*</b>	<b>125.2<math>\pm</math>7.3<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=15.84</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.14	F <sub>(1,22)</sub> =0.17
mRNA iNOS (AU)	1.01 $\pm$ 0.06	114.0 $\pm$ 8.2	<b>94.52<math>\pm</math>5.8<sup>#</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.83	F <sub>(1,22)</sub> =3.32	F <sub>(1,22)</sub> =1.95
mRNA COX-2 (AU)	1.09 $\pm$ 0.06	<b>122.8<math>\pm</math>5.1**</b>	110.6 $\pm$ 4.1	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.71</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.70	F <sub>(1,22)</sub> =2.55
mRNA mPGES-1 (AU)	1.01 $\pm$ 0.02	<b>124.1<math>\pm</math>5.9***</b>	<b>96.23<math>\pm</math>2.0<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.65</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=14.74</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=10.21</b>
WB NF $\kappa$ B (AU)	0.51 $\pm$ 0.02	<b>213.9<math>\pm</math>27.8**</b>	<b>109.4<math>\pm</math>10.5<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,14)</sub>=10.22</b>	<b>F<sub>(1,14)</sub>=7.25</b>	<b>F<sub>(1,14)</sub>=8.68</b>
WB I $\kappa$ B $\alpha$ (AU)	0.42 $\pm$ 0.01	<b>48.4<math>\pm</math>4.6**</b>	<b>140.5<math>\pm</math>16.7<sup>&amp;###</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.00	<b>F<sub>(1,22)</sub>=12.67</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=21.52</b>
WB iNOS (AU)	0.82 $\pm$ 0.03	<b>132.5<math>\pm</math>8.1**</b>	<b>92.3<math>\pm</math>6.5<sup>###</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.39	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.63</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.93</b>
WB COX-2 (AU)	0.35 $\pm$ 0.02	<b>136.2<math>\pm</math>9.3**</b>	112.9 $\pm$ 7.0	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.60</b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.11	F <sub>(1,22)</sub> =2.27
PGE2 (pg/mg prot)	12.9 $\pm$ 0.62	<b>143.3<math>\pm</math>6.3**</b>	122.3 $\pm$ 12.9	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.26</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.1	F <sub>(1,22)</sub> =3.01
MDA (nmol/mg prot)	0.24 $\pm$ 0.04	<b>194.0<math>\pm</math>23.1*</b>	<b>85.9<math>\pm</math>17.5<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.42	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.18</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.77</b>
Nitritos ( $\mu$ M/mg prot)	1.40 $\pm$ 0.13	119.9 $\pm$ 7.9	103.8 $\pm$ 6.0	F <sub>(1,22)</sub> =1.96	F <sub>(1,22)</sub> =0.75	F <sub>(1,22)</sub> =2.06
mRNA TLR4 (AU)	1.18 $\pm$ 0.09	<b>115.3<math>\pm</math>1.7*</b>	<b>95.72<math>\pm</math>5.5<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.51	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.45</b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.32
mRNA MD2 (AU)	1.09 $\pm$ 0.07	<b>121.9<math>\pm</math>4.6**</b>	<b>101.9<math>\pm</math>5.5<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=4.61</b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.00	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.20</b>
mRNA MyD88 (AU)	1.06 $\pm$ 0.02	<b>118.4<math>\pm</math>4.5*</b>	<b>99.9<math>\pm</math>5.0<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.43	F <sub>(1,22)</sub> =3.45	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.27</b>
WB TLR4 (AU)	0.91 $\pm$ 0.06	<b>137.1<math>\pm</math>9.7**</b>	<b>116.7<math>\pm</math>3.6<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=13.94</b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.61	F <sub>(1,22)</sub> =3.00
WB MD2 (AU)	0.94 $\pm$ 0.04	<b>157.9<math>\pm</math>16.6**</b>	<b>143.0<math>\pm</math>11.0<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=17.26</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.27	F <sub>(1,22)</sub> =0.54
WB MyD88 (AU)	0.92 $\pm$ 0.05	<b>133.5<math>\pm</math>12.5*</b>	<b>109.0<math>\pm</math>5.5<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.96</b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.92	F <sub>(1,22)</sub> =2.27
mRNA HSP60 (AU)	1.09 $\pm$ 0.03	<b>111.6<math>\pm</math>1.8**</b>	<b>111.0<math>\pm</math>2.2<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=18.48</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.00	F <sub>(1,22)</sub> =0.04
mRNA HSP70 (AU)	0.99 $\pm$ 0.04	95.0 $\pm$ 5.4	<b>126.6<math>\pm</math>9.6<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.44	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.07</b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.53
mRNA HMGB1(AU)	1.04 $\pm$ 0.03	98.9 $\pm$ 2.7	100.6 $\pm$ 1.9	F <sub>(1,22)</sub> =0.18	F <sub>(1,22)</sub> =0.43	F <sub>(1,22)</sub> =0.00
mRNA IL6 (AU)	0.98 $\pm$ 0.04	118.2 $\pm$ 3.8	114.5 $\pm$ 9.1	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.83</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.05	F <sub>(1,22)</sub> =0.12
mRNA IFN $\gamma$ (AU)	0.85 $\pm$ 0.05	112.2 $\pm$ 13.8	88.3 $\pm$ 4.5	F <sub>(1,22)</sub> =0.73	F <sub>(1,22)</sub> =2.94	F <sub>(1,22)</sub> =1.20
mRNA IL4 (AU)	1.03 $\pm$ 0.09	<b>77.4<math>\pm</math>3.6***</b>	<b>98.5<math>\pm</math>3.3<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=14.45</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=10.97</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.02</b>
mRNA TGF $\beta$ (AU)	1.05 $\pm$ 0.02	85.9 $\pm$ 4.7	97.7 $\pm$ 4.5	F <sub>(1,22)</sub> =3.50	F <sub>(1,22)</sub> =2.02	F <sub>(1,22)</sub> =0.83
mRNA CX3CL1 (AU)	0.98 $\pm$ 0.03	86.5 $\pm$ 4.1	<b>109.7<math>\pm</math>4.7<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.48	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.52</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.65</b>
mRNA IL10 (AU)	0.86 $\pm$ 0.06	<b>77.4<math>\pm</math>3.8*</b>	88.5 $\pm$ 5.3	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.14</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.86	F <sub>(1,22)</sub> =1.22
IL10 (pg/mg prot)	1211 $\pm$ 63	91.4 $\pm$ 2.5	99.9 $\pm$ 3.4	F <sub>(1,22)</sub> =0.20	F <sub>(1,22)</sub> =0.19	F <sub>(1,22)</sub> =2.79
mRNA ArgI (AU)	0.99 $\pm$ 0.03	105.2 $\pm$ 1.4	<b>113.2<math>\pm</math>2.9<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.20</b>	F <sub>(1,22)</sub> =4.17	F <sub>(1,22)</sub> =0.84
mRNA FOLR2 (AU)	1.19 $\pm$ 0.06	115.8 $\pm$ 7.8	111.4 $\pm$ 2.3	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.09</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.08	F <sub>(1,22)</sub> =0.23
WB ArgI (AU)	0.85 $\pm$ 0.05	<b>86.5<math>\pm</math>2.1*</b>	<b>109.3<math>\pm</math>2.5<sup>&amp;###</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.03	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.12</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=13.74</b>
WB FOLR2 (AU)	0.28 $\pm$ 0.02	77.0 $\pm$ 6.9	<b>107.4<math>\pm</math>4.8<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.60	F <sub>(1,22)</sub> =3.39	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.39</b>
mRNA PI3K (AU)	1.08 $\pm$ 0.04	<b>83.09<math>\pm</math>3.25**</b>	<b>100.4<math>\pm</math>2.58<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=4.56</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.05</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.49</b>
mRNA AKT (AU)	0.99 $\pm$ 0.01	102.3 $\pm$ 3.77	103.7 $\pm$ 4.50	F <sub>(1,22)</sub> =0.25	F <sub>(1,22)</sub> =0.22	F <sub>(1,22)</sub> =0.01
mRNA KEAP1 (AU)	1.01 $\pm$ 0.01	97.78 $\pm$ 2.96	93.03 $\pm$ 0.98	F <sub>(1,22)</sub> =2.86	F <sub>(1,22)</sub> =2.06	F <sub>(1,22)</sub> =0.48
mRNA NRF2 (AU)	1.06 $\pm$ 0.02	<b>87.12<math>\pm</math>2.42*</b>	<b>105.3<math>\pm</math>2.54<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.30	<b>F<sub>(1,22)</sub>=10.36</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.93</b>
WB PI3K (AU)	0.64 $\pm$ 0.03	<b>56.4<math>\pm</math>5.5***</b>	<b>108.8<math>\pm</math>6.5<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.19</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=16.24</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=26.09</b>
Ratio AKT (AU)	1.00 $\pm$ 0.05	<b>1.3<math>\pm</math>0.1*</b>	<b>1.3<math>\pm</math>0.1<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=12.58</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.18	F <sub>(1,22)</sub> =0.00
WB KEAP1 (AU)	0.49 $\pm$ 0.04	110.3 $\pm$ 6.1	126.7 $\pm$ 8.5	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.54</b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.24	F <sub>(1,22)</sub> =1.06
WB NRF2 (AU)	0.98 $\pm$ 0.05	<b>67.2<math>\pm</math>5.8**</b>	<b>85.9<math>\pm</math>3.5<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,14)</sub>=13.49</b>	F <sub>(1,14)</sub> =1.46	F <sub>(1,14)</sub> =4.24

**Tabla Resumen 5. Resultados de los efectos de PALI en corteza prefrontal en un modelo neuroinflamatorio crónico inducido por estrés.** Expresión proteica y niveles de mRNA de los diversos parámetros estudiados, expresados en porcentaje, de los grupos tratados con paliperidona y expuestos a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05, && p<0.01 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Estrés crónico

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Estrés	Tratamiento	Interacción
mRNA HO1 (AU)	1.10±0.03	<b>83.0±2.8*</b>	92.0±4.7	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.59</b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.21	F <sub>(1,22)</sub> =1.38
mRNA NQO1 (AU)	1.08±0.06	98.6±2.9	98.6±4.3	F <sub>(1,22)</sub> =0.15	F <sub>(1,22)</sub> =0.01	F <sub>(1,22)</sub> =0.01
mRNA SOD (AU)	0.97±0.04	<b>89.4±3.0*</b>	<b>101.0±2.1<sup>#</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.27	F <sub>(1,22)</sub> =3.39	F <sub>(1,22)</sub> =4.00
mRNA GPx (AU)	1.16±0.05	88.2±3.0	<b>100.2±1.9<sup>#</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.29	F <sub>(1,22)</sub> =3.49	F <sub>(1,22)</sub> =2.36
mRNA CAT (AU)	1.10±0.05	<b>82.6±2.2***</b>	<b>102.3±1.7<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.94</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=12.86</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.53</b>
mRNA L-PGDS (AU)	0.97±0.07	118.6±9.9	<b>143.2±6.7<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=8.78</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.85</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.42
WB L-PGDS (AU)	0.34±0.01	89.3±5.8	<b>148.5±9.7<sup>&amp;&amp;###</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.76</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=14.18</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=15.99</b>
15d-PGJ2 (pg/mg prot)	3.84±0.12	<b>78.5±2.0*</b>	<b>104.9±7.1<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.31	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.97</b>	F <sub>(1,22)</sub> =3.13
mRNA PPARγ(AU)	0.92±0.05	<b>77.3±3.3***</b>	<b>96.9±3.4<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=12.01</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.88</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.21</b>
WB PPARγ (AU)	0.93±0.05	86.6±6.3	<b>122.9±8.3<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,14)</sub> =0.21	<b>F<sub>(1,14)</sub>=6.49</b>	<b>F<sub>(1,14)</sub>=4.86</b>
Act PPARγ (AU)	0.42±0.03	0.30±0.02	0.34±0.03	F <sub>(1,14)</sub> =4.10	F <sub>(1,14)</sub> =0.30	F <sub>(1,14)</sub> =0.37
mRNA CB1 (AU)	0.97±0.02	<b>90.5±1.0**</b>	<b>102.8±1.8<sup>###</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.59	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.51</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=14.09</b>
WB CB1 (AU)	0.43±0.04	84.7±7.0	<b>123.4±8.1<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.54	<b>F<sub>(1,22)</sub>=4.88</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.00</b>
mRNA CB2 (AU)	1.16±0.05	<b>78.4±5.2**</b>	88.0±1.6	<b>F<sub>(1,22)</sub>=18.20</b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.83	F <sub>(1,22)</sub> =0.73
mRNA TRPV1(AU)	0.99±0.04	83.5±6.0	<b>113.2±7.2<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.23	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.09</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.04</b>
mRNA NAPE (AU)	1.09±0.02	107.7±5.0	<b>112.5±2.3<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.18</b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.47	F <sub>(1,22)</sub> =0.55
mRNA FAAH (AU)	0.98±0.02	<b>86.5±2.2**</b>	<b>91.28±3.4<sup>&amp;</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=19.83</b>	F <sub>(1,22)</sub> =1.48	F <sub>(1,22)</sub> =0.28
mRNA DAGLα(AU)	0.65±0.06	<b>78.6±2.5**</b>	<b>101.9±3.8<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =4.28	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.02</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=4.87</b>
mRNA MAGL (AU)	1.10±0.04	98.0±2.5	96.0±1.7	F <sub>(1,22)</sub> =1.17	F <sub>(1,22)</sub> =0.03	F <sub>(1,22)</sub> =0.22
WB NAPE (AU)	0.43±0.03	95.2±3.7	111.0±6.8	F <sub>(1,22)</sub> =0.57	F <sub>(1,22)</sub> =1.28	F <sub>(1,22)</sub> =2.51
WB FAAH (AU)	0.75±0.05	<b>74.2±4.1*</b>	90.3±5.2	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.71</b>	F <sub>(1,22)</sub> =2.32	F <sub>(1,22)</sub> =1.19
WB DAGLα (AU)	0.65±0.02	82.0±6.9	<b>120.5±6.1<sup>###</sup></b>	F <sub>(1,22)</sub> =0.03	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.37</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=9.76</b>
WB MAGL (AU)	1.26±0.09	<b>71.3±4.4**</b>	<b>101.4±5.8<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=5.61</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=6.81</b>	<b>F<sub>(1,22)</sub>=7.23</b>

Continuación Tabla Resumen 5. Resultados de los efectos de PALI en corteza prefrontal en un modelo neuroinflamatorio crónico inducido por estrés. Expresión proteica y niveles de mRNA de los diversos parámetros estudiados, expresados en porcentaje, de los grupos tratados con paliperidona y expuestos a estrés con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05, && p<0.01 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Estrés crónico

### 3. NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR ACTIVACIÓN INMUNE PRENATAL (MIA).

Establecido el papel del antipsicótico paliperidona en el balance inflamatorio/antiinflamatorio frente a estímulos inflamatorios como el estrés o la exposición a LPS, nuestro siguiente objetivo fue evaluar dichas propiedades en un modelo animal de esquizofrenia. Para ello, se utilizó un modelo de infección inmune prenatal, en donde mediante la administración de un mimético de RNA viral, el Poly(I:C), se infectaron ratonas en el noveno día gestacional y las crías nacidas fueron utilizadas alrededor de las ocho semanas de edad, que coincide con la aparición de comportamientos propios de la enfermedad. Los animales se separaron en grupos, y uno de ellos recibió durante 21 días el tratamiento con paliperidona a una dosis de 0,05mg/kg. Posteriormente, se evaluó el deterioro cognitivo mediante el test de comportamiento de laberinto en T o “T-Maze”.

Se analizó el balance inflamatorio/antiinflamatorio presente en estos animales, al igual que la activación del sistema inmune a través de la vía del TLR3. De igual manera que en los estudios anteriores, se evaluó la actividad de la vía antioxidante y del sistema endocannabinoide. Todos los resultados aquí expuestos se realizaron en corteza prefrontal.

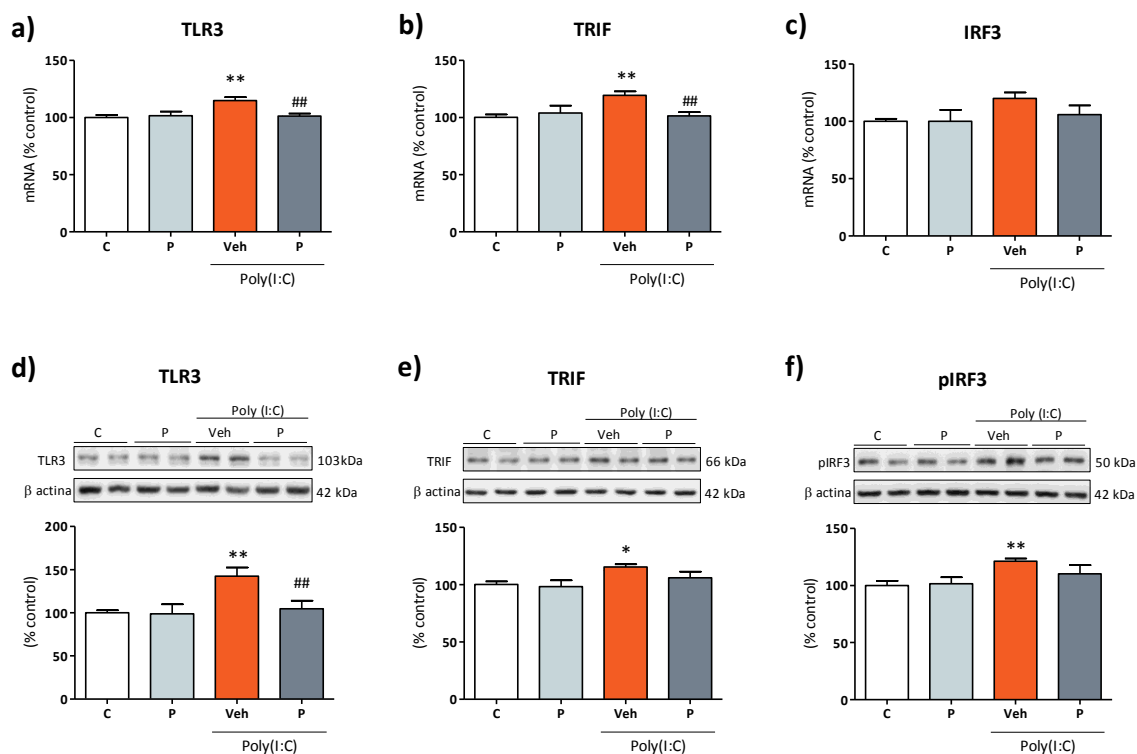
#### 3.1 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL TLR3 INDUCIDA POR LA INFECCIÓN INMUNE PRENATAL EN PFC.

La activación inmune mediante virus de RNA de doble hebra o miméticos como el Poly(I:C), se desencadena mediante el reconocimiento antigénico a través del TLR3. Por lo que nuestro primer objetivo en este bloque, fue estudiar la activación de la vía del TLR3.

El grupo de ratones expuestos a infección inmune prenatal que conforman el modelo animal de esquizofrenia *per se*, presentan tanto a nivel de mRNA como de proteína, un aumento en los niveles del receptor TLR3 (Fig.53a, d), de igual manera existe un aumento en su molécula adaptadora TRIF (Fig.53b, e). A pesar de no presentar un aumento significativo en los niveles de mRNA de IRF3, si se observa en el aumento significativo de la forma fosforilada de la proteína IRF3, es decir la activa (Fig.53c, f).

Por su parte, el tratamiento con paliperidona previene el aumento de los niveles de mRNA y proteicos de TLR3 inducidos por la activación inmune prenatal (Fig.53a, d). De igual manera evita el aumento de los niveles de mRNA de TRIF (Fig.53b). Respecto a los niveles de IRF3, estos se mantienen sin cambios respecto al grupo control (Fig.53c, f).





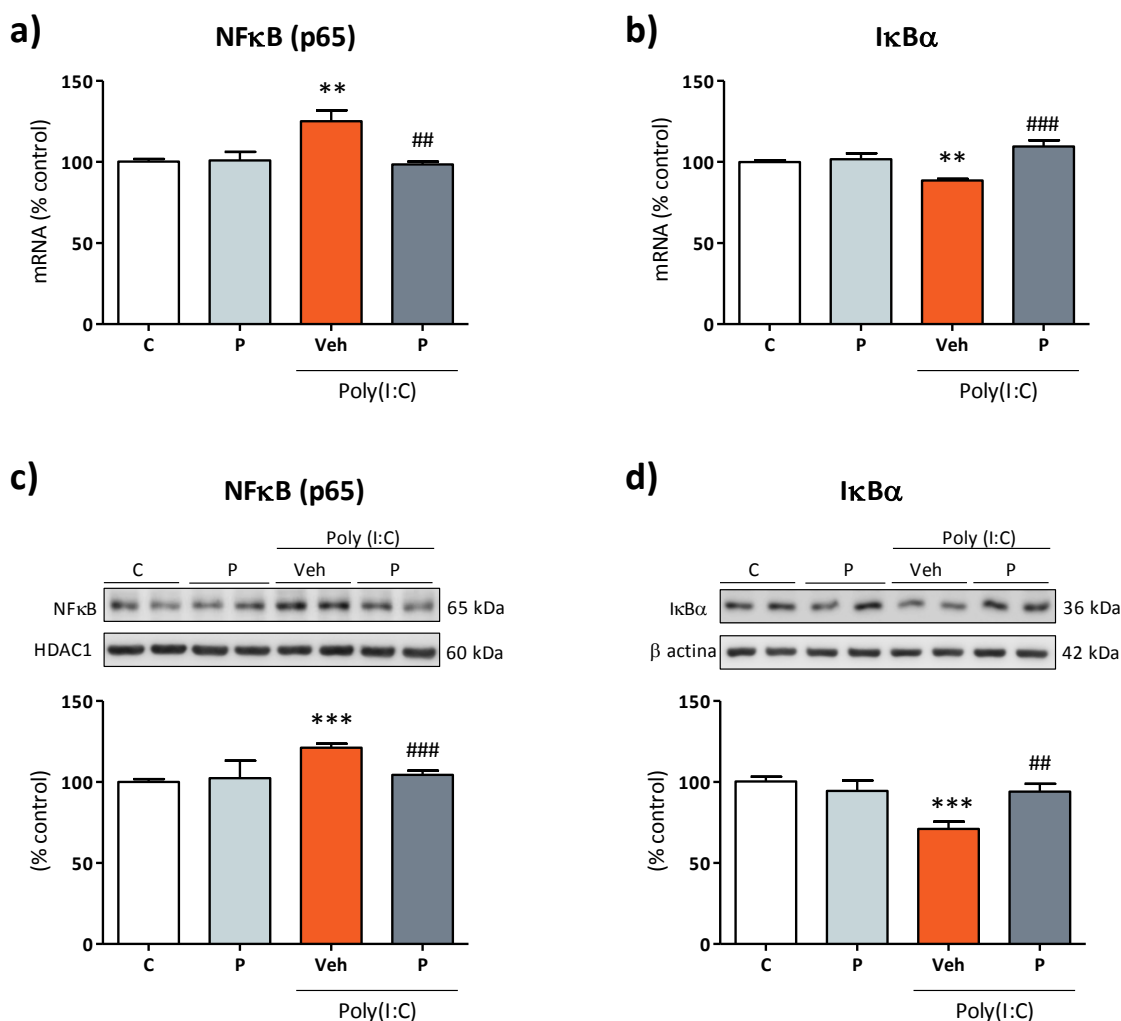
**Figura 53. Efecto de Paliperidona en la activación de la vía del TLR3 inducida por activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de TLR3, TRIF e IRF3 (a-c); niveles proteicos de TLR3, TRIF y pIRF3 (d-f) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=3-9). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. C; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs Veh+ Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

### 3.2 EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL NF $\kappa$ B Y LA POSTERIOR INFLAMACIÓN INDUCIDA POR LA INFECCIÓN INMUNE PRENATAL EN PFC.

Otro factor de transcripción que se activa a consecuencia de la activación de TLR3, es el NF $\kappa$ B. Es por ello, que el siguiente objetivo fue estudiar la activación de dicha vía, y el posterior balance inflamatorio/antiinflamatorio presente en la corteza prefrontal de estos animales.

Bajo condiciones de activación inmune prenatal, los niveles de mRNA de NF $\kappa$ B están aumentados, mientras que los de su proteína inhibitoria, I $\kappa$ B $\alpha$ , están disminuidos (Fig.54a, b). Estos cambios se confirman con el aumento en los niveles proteicos de NF $\kappa$ B en el núcleo, y el descenso de los niveles proteicos de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citosol (Fig.54c, d). Por su parte, la administración de paliperidona previene el aumento de los niveles de NF $\kappa$ B y la disminución de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ , tanto a nivel del mRNA como a nivel proteico (Fig.54a-d).

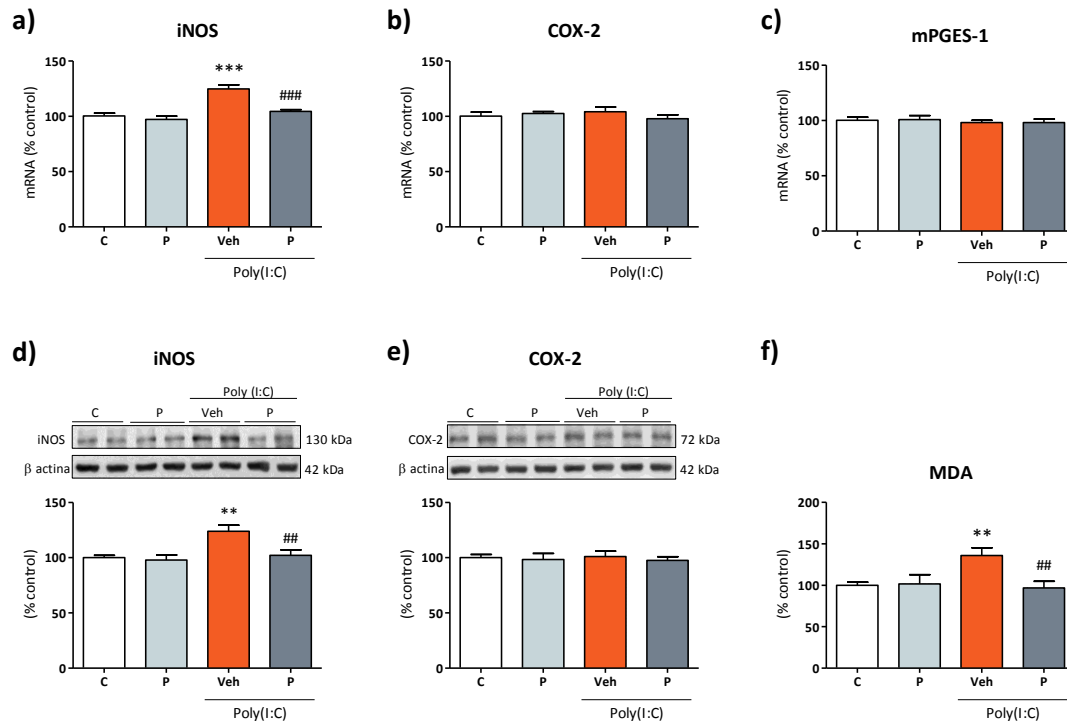




**Figura 54. Efecto de Paliperidona en la activación de la vía del NFκB inducida por activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de NFκB e IκBα (a,b); niveles proteicos de NFκB e IκBα (c,d) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=3-9). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. C; ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+ Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

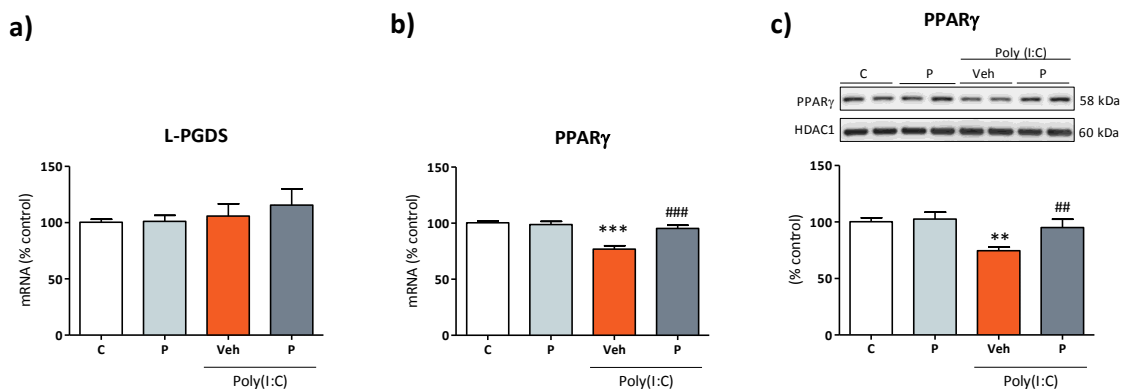
Por otro lado, la activación de la vía del NFκB en los animales expuestos solo a la activación inmune prenatal, indujo un aumento en los niveles de mRNA de iNOS, pero no en los de COX-2, al igual que tampoco afectó los niveles de mPGES-1 (Fig.55a-c). A nivel proteico los niveles de iNOS se observan aumentados, y se confirma que COX-2 no se altera por la infección prenatal (Fig.55d, e). Como consecuencia de esta inflamación, los niveles de peroxidación lipídica se encuentran aumentados (Fig.55f).

El tratamiento con paliperidona evita el aumento de los niveles de mRNA y proteicos de iNOS, al igual que el aumento de los niveles de peroxidación lipídica inducidos por la activación inmune prenatal (Fig.55a, d, f). Por otro lado, no afecta los niveles de COX-2 ni mPGES-1 (Fig.55b, c).



**Figura 55. Efecto de Paliperidona en la neuroinflamación inducida por la activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de iNOS, COX-2 y mPGES-1 (a-c); niveles proteicos de iNOS y COX-2 (d, e); niveles de peroxidación lipídica (f) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=3-9). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. C; #p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+ Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

A continuación se estudió la vía antiinflamatoria que tiene como punto de inicio la activación de COX-2. Confirmando la inactividad de las vías dependientes de COX-2, la enzima L-PGDS no muestra cambios en sus niveles de mRNA (Fig.56a). Sin embargo, la parte de esta vía antiinflamatoria independiente de la actividad de COX-2, dada por el receptor PPAR $\gamma$ , en animales expuestos a MIA (*“Maternal immune activation”*), presentan una disminución de los niveles de mRNA y proteicos, los cuales son reestablecidos a niveles normales cuando se administra el antipsicótico (Fig.56b, c).

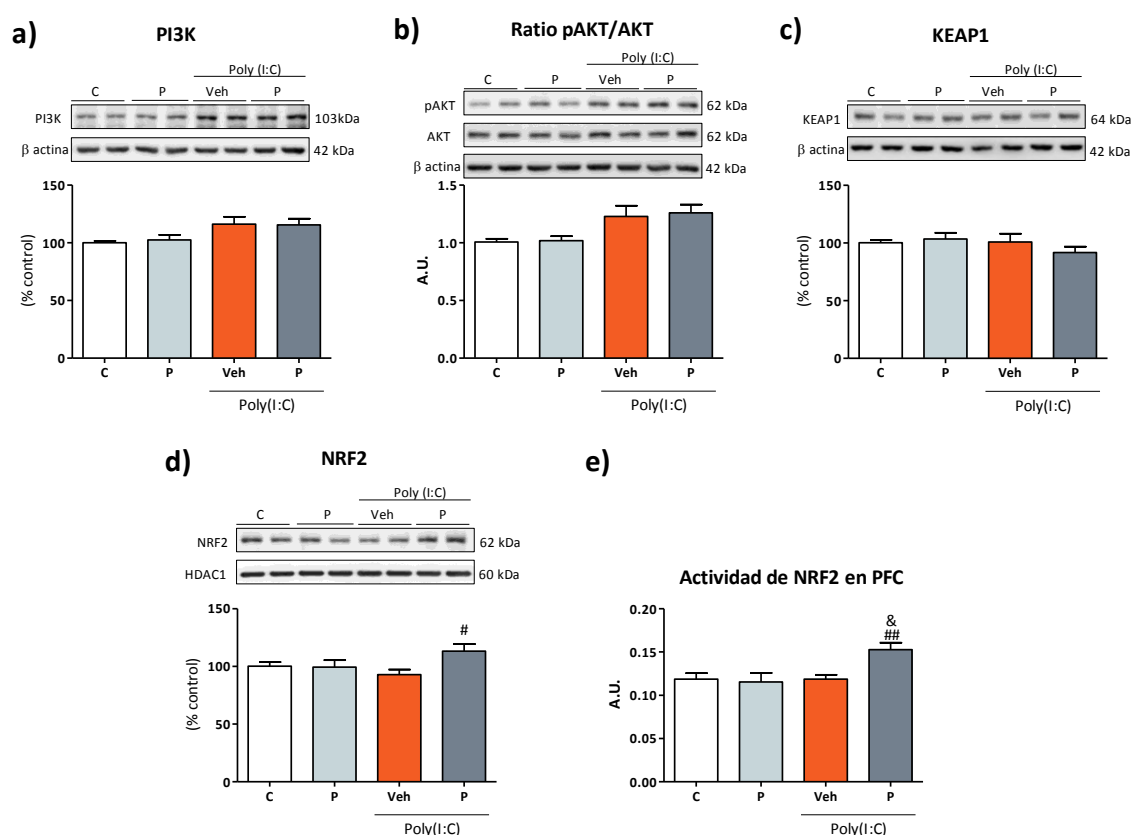


**Figura 56. Efecto de Paliperidona en la vía antiinflamatoria de PPAR $\gamma$  inducida por la activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de L-PGDS y PPAR $\gamma$  (a,b); niveles proteicos de PPAR $\gamma$  (c) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=3-9). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs. C; ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+ Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

### 3.3 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA ANTIOXIDANTE DE NRF2.

El mecanismo de defensa antioxidante orquestado por el factor de transcripción nuclear NRF2 no se observa significativamente alterado a nivel proteico por la activación inmune prenatal (Fig.57a-e), al igual que tampoco se observan cambios en los niveles de mRNA (Tabla 12).

Sin embargo, el tratamiento con paliperidona induce un aumento en los niveles proteicos y de actividad del factor NRF2 en el núcleo con respecto al grupo control (Fig.57d, e). De igual manera el antipsicótico indujo una disminución de los niveles de mRNA de la proteína inhibitoria de NRF2, KEAP1, respecto al grupo expuesto solo a la infección prenatal (Tabla 12).



**Figura 57. Efecto de PALI en la activación de la vía del NRF2 bajo condiciones de activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles proteicos de PI3K (a), ratio entre los niveles proteicos de pAKT y AKT total (b), niveles proteicos del inhibidor KEAP1 (c) y el factor de traslocación nuclear NRF2 (d), niveles de actividad nuclear de NRF2 (e) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=3-9). \* $p < 0.05$  vs. C. ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

Parámetro	Valor Control	% Veh	% PALI
		Poly(I:C)	
PI3K	1.15±0.06	103.4±2.86	103.1±2.38
AKT	1.22±0.04	101.2±2.32	103.3±4.05
KEAP1	1.09±0.02	103.7±2.58	92.13±3.35 <sup>#</sup>
NRF2	1.03±0.03	101.1±2.30	98.60±2.01

Tabla 12. Efectos de Paliperidona en los niveles de mRNA de los elementos participantes en la vía del NRF2.

Niveles de mRNA de PI3K, AKT, KEAP1 y NRF2 en porcentaje de los grupos expuestos a activación inmune prenatal respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni # p<0.05, vs. Veh+Poly(I:C)

Respecto a los elementos de respuesta antioxidante que se inducen mediante la activación de la vía del NRF2, el único cambio observado bajo las condiciones de infección prenatal fue la disminución de los niveles de mRNA de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fig.58c).

Por su parte, el tratamiento con paliperidona indujo un aumento significativo en los niveles de mRNA de la enzima hemo oxigenasa 1 con respecto a los grupos control y al grupo expuesto solo a la infección prenatal (Fig.58a). Además, previene la disminución de los niveles de mRNA de SOD inducidos por la activación inmune prenatal (Fig.58c) y aumenta los niveles de la enzima catalasa respecto al grupo expuesto a la infección prenatal (Fig.58e)

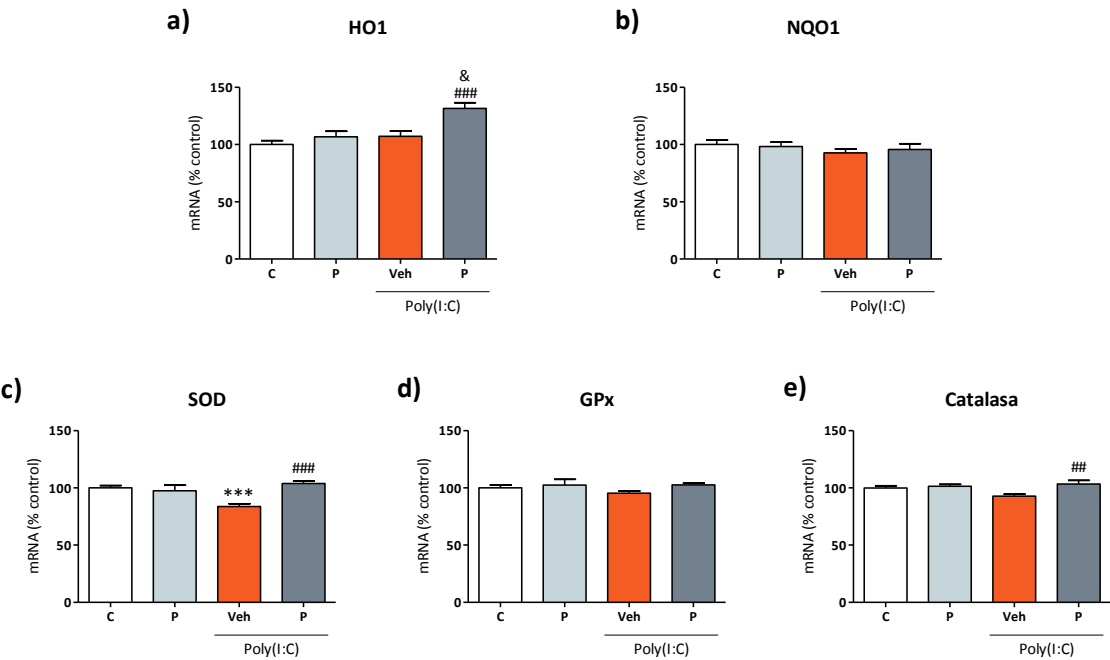
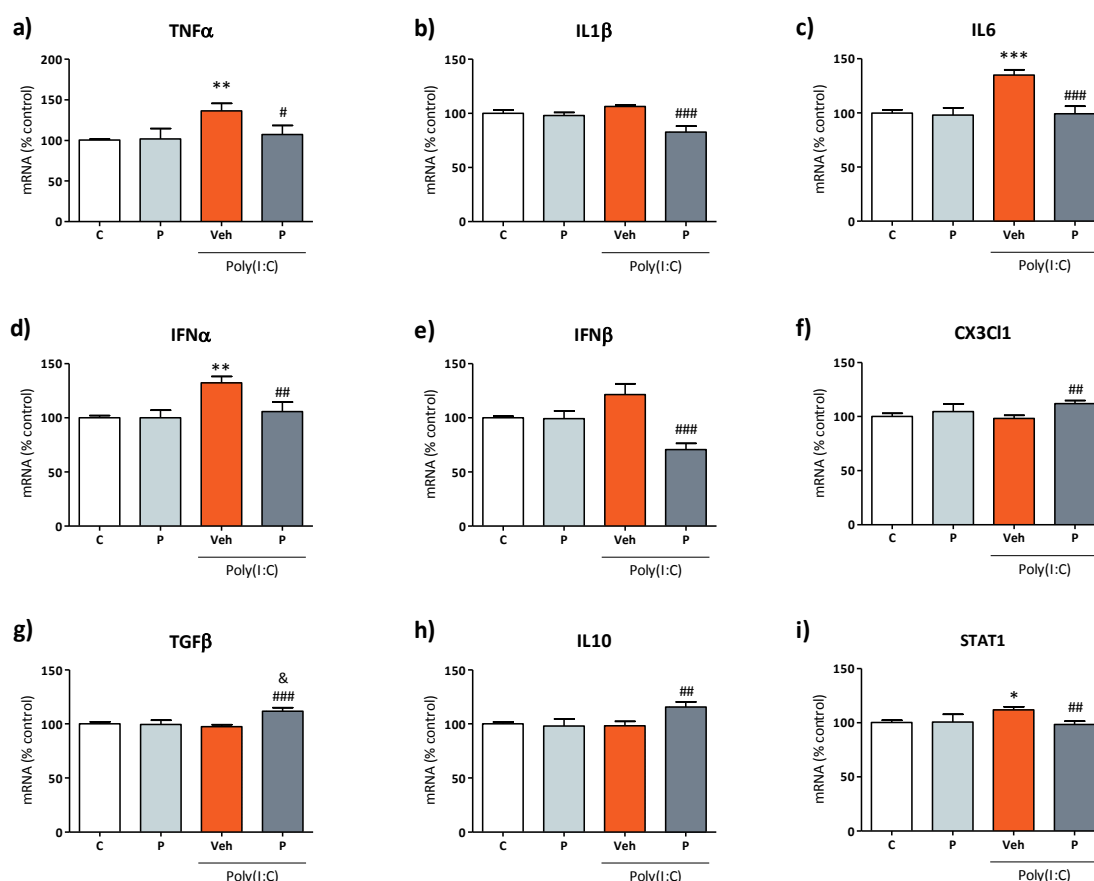


Figura 58. Efecto de PALI en los productos de la vía del NRF2 bajo condiciones de activación inmune prenatal en corteza prefrontal. Niveles de mRNA de Hemo oxigenasa 1 (HO1), NAD(P)H:Quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), Superóxido dismutasa (SOD), Glutacion peroxidasa (GPx) y Catalasa en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=3-9). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. C; && p<0.01 vs P; # p<0.05, ### p<0.001 vs Veh+Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

### 3.4 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT1.

La traslocación al núcleo de los factores de transcripción pIRF3 y NFκB, inducen en la síntesis de diversas citoquinas proinflamatorias en el caso del NFκB, y citoquinas antivirales de tipo interferón en el caso de pIRF3. A su vez, la secreción de los interferones de tipo I estimula la síntesis de otro factor de transcripción, STAT1.

Bajo condiciones de activación inmune prenatal, los niveles de mRNA de las citoquinas inflamatorias TNFα e IL6 se encuentran aumentadas, pero no los de IL1β (Fig.59a-c). En cuanto a los interferones estudiados, sólo los niveles de mRNA de IFNα se encuentran significativamente elevados, pero no los de IFNβ (Fig.59d, e). De igual manera, no se observan cambios en los niveles de mRNA de CX3CL1, TGFβ, ni IL10 (Fig.59f, h), pero sí un aumento en los niveles de STAT1 (Fig.59i). Por su parte, paliperidona previene el aumento de las citoquinas proinflamatorias TNFα e IL6, del IFNα y STAT1 inducidos por la infección prenatal (Fig.59a, c, d, i). Por otro lado, induce una disminución en los niveles de mRNA de IL1β e IFNβ respecto al modelo animal *per se* (Fig.59b, e). Además, induce un aumento en los niveles de mRNA de CX3CL1 y de las citoquinas antiinflamatorias TGFβ e IL10, respecto al grupo solo expuesto a Poly(I:C) (Fig.59f-h).

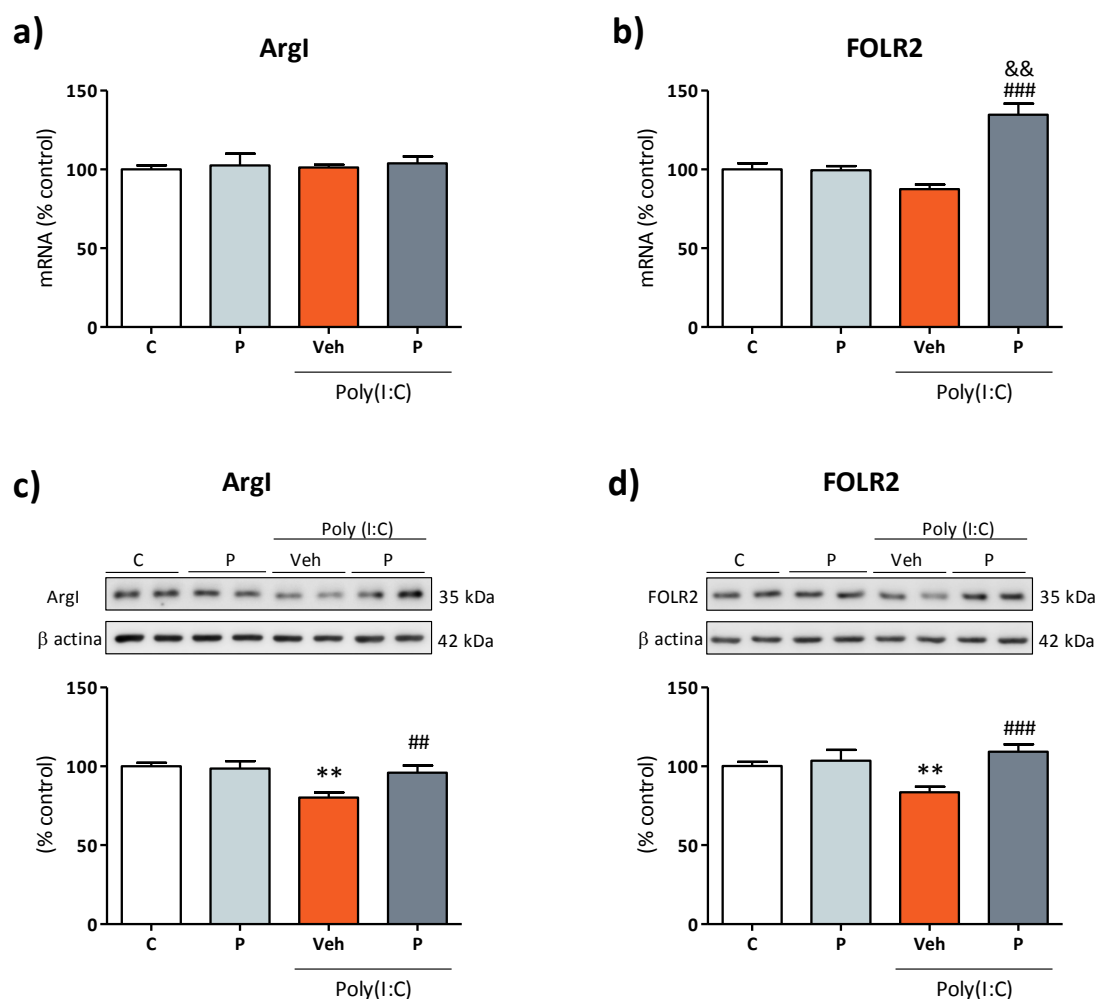


**Figura 59. Efecto de PALI en los niveles de citoquinas y el factor de transcripción STAT1 inducidos por la activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de TNFα, IL1β, IL6, IFNα, IFNβ, CX3CL1, TGFβ, IL10 y STAT1 (a-i) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=3-9). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. C; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Veh+Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

### 3.5 EFECTO DE PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL (FENOTIPO M1/M2)

La activación inmune prenatal no tiene efecto sobre los niveles de mRNA de los marcadores microgliales antiinflamatorios M2, Arg1 y FOLR2, pero si disminuyen significativamente sus niveles proteicos (Fig.60a-d).

Por otro lado, la administración del antipsicótico no modifica los niveles de mRNA de Arg1 (Fig.60a), pero si aumenta los niveles de mRNA de FOLR2 respecto a los grupos control y al grupo expuesto a la infección prenatal (Fig.60b). Respecto a los niveles proteicos, paliperidona previene la disminución de ambos marcadores inducidos por la infección prenatal (Fig.60c, d).

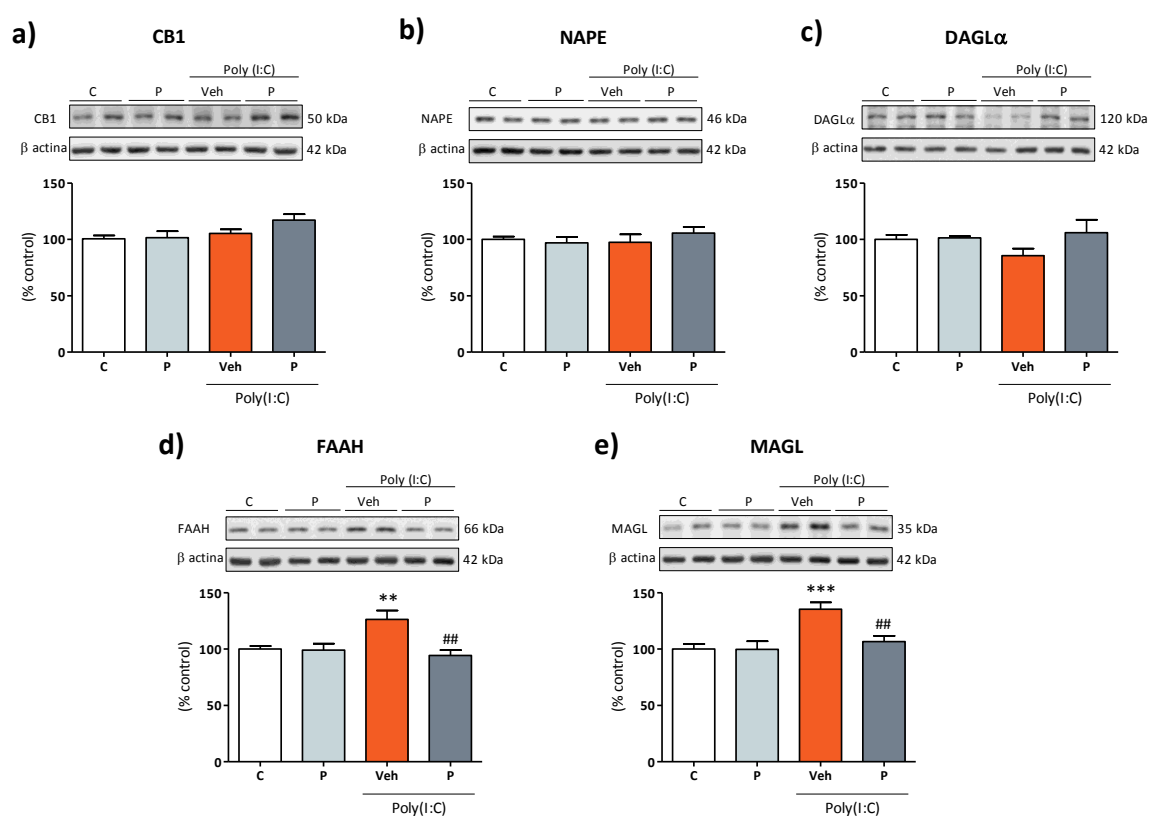


**Figura 60. Efecto de PALI en los marcadores de activación microglial de tipo M2 bajo condiciones de activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de Arg1 y FOLR2 (a-b), niveles proteicos de Arg1 y FOLR2 (c,d) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=3-9). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. C; ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs Veh+Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

### 3.6 EFECTO DE PALIPERIDONA EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

Bajo condiciones de activación inmune prenatal, no se observan cambios en los niveles proteicos del receptor CB1, ni en las enzimas de síntesis de los endocannabinoides AEA y 2AG, NAPE y DAGL $\alpha$  respectivamente (Fig.61a-c), pero si se observa un aumento significativo en los niveles proteicos de las enzimas de degradación FAAH y MAGL (Fig.61d, e), dicho aumento también se observa en los niveles de mRNA de FAAH y MAGL (Tabla 13).

Por su parte, el tratamiento con paliperidona previene el aumento de los niveles proteicos de las enzimas de degradación FAAH y MAGL (Fig.61d, e), al igual que el aumento de los niveles de mRNA de MAGL (Tabla 13) inducidos por la activación inmune prenatal.



**Figura 61. Efectos de Paliperidona en el sistema endocannabinoide bajo condiciones de activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles proteicos del receptor CB1 (a), de las enzimas de síntesis NAPE y DAGL $\alpha$  (b,c), y de las enzimas de degradación FAAH y MAGL (d,e) en corteza prefrontal de ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=3-9). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. C; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs Veh+Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.

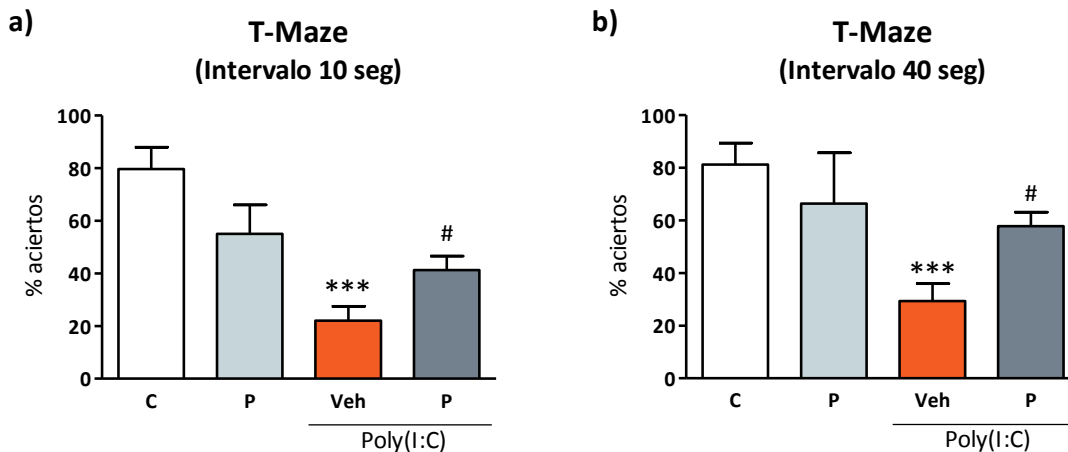
Parámetro	Valor Control	% Veh Poly(I:C)	% PALI
CB1	0.86±0.05	100.1±2.16	102.6±6.22
CB2	1.25±0.09	99.37±2.99	98.31±5.48
NAPE	1.44±0.11	99.53±2.97	98.39±2.82
FAAH	1.36±0.11	<b>116.1±3.53*</b>	104.4±2.39
DAGLα	1.31±0.10	101.0±3.75	112.7±3.09
MAGL	1.30±0.10	<b>124.2±4.07**</b>	<b>104.5±3.36##</b>

**Tabla 13. Efectos de Paliperidona en el sistema endocannabinoide bajo condiciones de activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Niveles de mRNA de CB1, CB2, NAPE, FAAH, DAGLα y MAGL en porcentaje de los grupos expuestos a la activación inmune prenatal respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias, AU). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test Bonferroni \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  vs. Control; ###  $p<0.001$  vs. Veh+Poly(I:C).

### 3.7 EFECTO DE PALIPERIDONA EN EL DETERIORO COGNITIVO.

Finalmente, el último objetivo de este bloque de resultados se centró en estudiar el deterioro cognitivo presente en los animales expuestos a la activación inmune prenatal, mediante la prueba comportamental T-Maze, la cual evalúa el aprendizaje y la memoria espacial.

Bajo condiciones de activación inmune prenatal, los animales presentaron una disminución significativa en el nivel de aprendizaje y memoria respecto al grupo control, lo cual se refleja en el bajo porcentaje de elecciones correctas realizadas durante los test, ya sea con un intervalo de 10 o 40 segundos entre los diferentes intentos. Por su parte, el tratamiento crónico con paliperidona previene la disminución inducida por la infección prenatal en ambos intervalos de tiempo (Fig.62a, b).



**Figura 62. Efectos de Paliperidona en el deterioro cognitivo bajo condiciones de activación inmune prenatal en corteza prefrontal.** Representación gráfica del porcentaje de elecciones correctas durante el test comportamental T-Maze en repeticiones con un intervalo de 10 segundos(a), o a intervalos de 40 segundos (b) en ratones control (C y P) y expuestos a la activación inmune prenatal (Veh y P). Los datos son representativos de la media ± EEM (n=3-9). \*\*\* $p<0.001$  vs. C; #  $p<0.05$  vs Veh+Poly(I:C). ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni.



### 3.8 RESUMEN DE RESULTADOS:

Los resultados derivados del tercer bloque de experimentos, se sintetizan en la tabla resumen 6.

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Poly(I:C)	Tratamiento	Interacción
<b>mRNA NFκB(AU)</b>	0.98±0.01	<b>125.2±6.77**</b>	<b>98.58±1.75<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.65</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.23</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.79</b>
<b>mRNA IκBα (AU)</b>	1.06±0.02	<b>88.72±0.97**</b>	<b>109.6±3.69<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.38</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=17.74</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=12.52</b>
<b>mRNA iNOS(AU)</b>	1.08±0.03	<b>124.8±3.75***</b>	<b>104.5±1.45<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=22.74</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=12.49</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.67</b>
<b>mRNA COX2(AU)</b>	1.33±0.16	104.2±4.18	97.89±3.42	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.01</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.20</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.03</b>
<b>mRNA mPGES-1 (AU)</b>	1.19±0.06	98.19±2.09	98.19±3.19	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.53</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.01</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.01</b>
<b>WB NFκB (AU)</b>	0.50±0.01	<b>121.2±2.5***</b>	<b>104.5±2.5<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=11.11</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.28</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.38</b>
<b>WB IκBα (AU)</b>	1.13±0.07	<b>71.03±4.47***</b>	<b>94.02±4.93<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=8.65</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=2.87</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=8.12</b>
<b>WB iNOS (AU)</b>	0.59±0.02	<b>123.9±5.71**</b>	<b>102.1±4.96<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.60</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.83</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.24</b>
<b>WB COX-2 (AU)</b>	1.20±0.08	101.0±4.91	97.53±3.42	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.00</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.31</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.04</b>
<b>MDA (nmol/mg prot)</b>	0.90±0.1	<b>136.1±9.08**</b>	<b>96.81±8.16<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.00</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.35</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.22</b>
<b>mRNA TLR3 (AU)</b>	1.14±0.05	<b>114.8±2.94**</b>	<b>101.3±2.35<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.46</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.77</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.03</b>
<b>mRNA TRIF (AU)</b>	0.95±0.02	<b>119.4±3.45**</b>	<b>101.4±3.34<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.54</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.36</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.64</b>
<b>mRNA IRF3 (AU)</b>	1.14±0.05	120.1±5.13	105.9±7.91	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.70</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.11</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.10</b>
<b>WB TLR3 (AU)</b>	0.84±0.02	<b>142.5±9.86**</b>	<b>104.8±9.30<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.19</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.05</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.52</b>
<b>WB TRIF (AU)</b>	0.70±0.04	<b>115.4±2.44*</b>	106.1±5.22	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.11</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.70</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.75</b>
<b>WB pIRF3 (AU)</b>	0.48±0.02	<b>121.3±2.43**</b>	110.3±7.42	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.68</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.67</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.13</b>
<b>mRNA TNFα (AU)</b>	0.93±0.04	<b>136.4±9.34**</b>	<b>107.2±11.3<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.36</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.97</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=2.35</b>
<b>mRNA IL1β (AU)</b>	1.26±0.09	106.4±1.35	<b>82.70±5.51<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.16</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=9.53</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.76</b>
<b>mRNA IL6 (AU)</b>	1.10±0.06	<b>135.1±4.63***</b>	<b>99.31±6.89<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=9.19</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=9.85</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.93</b>
<b>mRNA IFNα (AU)</b>	0.96±0.02	<b>132.3±5.86**</b>	<b>105.8±8.71<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.87</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.36</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.34</b>
<b>mRNA IFNβ (AU)</b>	0.97±0.01	121.4±10.11	<b>70.63±5.73<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.19</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=9.38</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=8.78</b>
<b>mRNA CX3CL1 (AU)</b>	1.07±0.04	98.27±2.79	<b>112.0±2.80<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.57</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.37</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.59</b>
<b>mRNA TGFβ(AU)</b>	0.96±0.02	97.50±1.83	<b>111.6±3.41<sup>&amp;###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=2.71</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.21</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.37</b>
<b>mRNA IL10 (AU)</b>	1.43±0.05	98.25±4.25	<b>115.5±4.92<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=2.77</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=2.63</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.26</b>
<b>mRNA STAT1 (AU)</b>	1.14±0.05	<b>112.0±7.18*</b>	<b>98.39±3.10<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.97</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.83</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.30</b>
<b>mRNA ArgI (AU)</b>	1.13±0.05	101.2±1.68	103.9±4.46	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.10</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.45</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.00</b>
<b>mRNA FOLR2 (AU)</b>	1.09±0.04	87.50±2.88	<b>134.7±6.94<sup>&amp;&amp;###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.28</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=17.90</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=18.83</b>
<b>WB ArgI (AU)</b>	0.78±0.02	<b>80.26±3.17**</b>	<b>96.11±4.47<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.67</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.18</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.57</b>
<b>WB FOLR2 (AU)</b>	0.77±0.01	<b>83.61±3.48**</b>	<b>109.3±4.81<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.49</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=10.17</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.19</b>
<b>mRNA PI3K (AU)</b>	1.15±0.06	103.4±2.86	103.1±2.38	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.06</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.25</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.33</b>
<b>mRNA AKT (AU)</b>	1.22±0.04	101.2±2.32	103.3±4.05	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.29</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.15</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.04</b>
<b>mRNA KEAP1 (AU)</b>	1.09±0.02	103.7±2.58	<b>92.13±3.35<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.08</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.42</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=1.98</b>
<b>mRNA NRF2(AU)</b>	1.03±0.03	101.1±2.30	98.60±2.01	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.15</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.00</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.54</b>
<b>WB PI3K (AU)</b>	1.37±0.07	116.0±6.40	115.5±5.31	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.06</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.02</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.06</b>
<b>Ratio AKT (AU)</b>	1.00±0.02	1.23±0.09	1.25±0.07	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.79</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.06</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.01</b>
<b>WB KEAP1 (AU)</b>	0.82±0.04	100.9±7.02	91.68±4.98	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.80</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.22</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.99</b>
<b>WB NRF2 (AU)</b>	0.51±0.05	92.99±4.25	<b>113.2±6.29<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=0.35</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=2.94</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.43</b>
<b>Act NRF2 (AU)</b>	0.11±0.006	0.11±0.004	<b>0.15±0.008<sup>&amp;###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.57</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=3.76</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.63</b>

**Tabla Resumen 6. Resultados de los efectos de PALI en corteza prefrontal en un modelo de esquizofrenia por activación inmune prenatal.** Expresión proteica y niveles de mRNA de los diversos parámetros estudiados, expresados en porcentaje, de los grupos tratados o no con paliperidona y expuestos a Poly(I:C) con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05, && p<0.01 vs. Veh+PALI; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Poly(I:C).

Parámetro	Valor Control	% Veh	%PALI	Poly(I:C)	Tratamiento	Interacción
mRNA HO1 (AU)	1.18±0.03	107.2±4.71	<b>131.6±4.92<sup>&amp;###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=9.42</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=9.02</b>	F <sub>(1,24)</sub> =2.86
mRNA NQO1 (AU)	1.18±0.05	92.7±3.44	95.6±5.00	F <sub>(1,24)</sub> =1.07	F <sub>(1,24)</sub> =0.02	F <sub>(1,24)</sub> =0.22
mRNA SOD (AU)	1.14±0.03	<b>83.8±2.35<sup>***</sup></b>	<b>103.9±2.28<sup>###</sup></b>	F <sub>(1,24)</sub> =3.16	<b>F<sub>(1,24)</sub>=10.24</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=16.57</b>
mRNA GPx (AU)	1.02±0.02	95.46±2.01	102.6±1.66	F <sub>(1,24)</sub> =0.73	F <sub>(1,24)</sub> =3.54	F <sub>(1,24)</sub> =0.81
mRNA CAT (AU)	1.16±0.04	92.81±1.67	<b>103.5±3.06<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,24)</sub> =1.00	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.43</b>	F <sub>(1,24)</sub> =3.10
mRNA L-PGDS (AU)	0.98±0.04	105.9±10.7	115.6±14.4	F <sub>(1,24)</sub> =0.74	F <sub>(1,24)</sub> =0.20	F <sub>(1,24)</sub> =0.14
mRNA PPAR $\gamma$ (AU)	1.02±0.02	<b>76.88±2.93<sup>***</sup></b>	<b>95.37±2.81<sup>###</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=19.73</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.93</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=10.82</b>
WB PPAR $\gamma$ (AU)	0.68±0.04	<b>74.51±3.13<sup>**</sup></b>	<b>95.16±7.26<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=8.37</b>	F <sub>(1,24)</sub> =4.01	F <sub>(1,24)</sub> =2.57
mRNA CB1 (AU)	0.86±0.05	100.1±2.16	102.6±6.22	F <sub>(1,24)</sub> =0.07	F <sub>(1,24)</sub> =0.08	F <sub>(1,24)</sub> =0.06
mRNA CB2 (AU)	1.25±0.09	99.37±2.99	98.31±5.48	F <sub>(1,24)</sub> =0.00	F <sub>(1,24)</sub> =0.12	F <sub>(1,24)</sub> =0.03
mRNA NAPE (AU)	1.44±0.11	99.53±2.97	98.39±2.82	F <sub>(1,24)</sub> =0.28	F <sub>(1,24)</sub> =0.03	F <sub>(1,24)</sub> =0.18
mRNA FAAH (AU)	1.36±0.11	<b>116.1±3.53<sup>*</sup></b>	104.4±2.39	F <sub>(1,24)</sub> =3.06	F <sub>(1,24)</sub> =0.75	F <sub>(1,24)</sub> =2.17
mRNA DAGL $\alpha$ (AU)	1.31±0.10	101.0±3.75	112.7±3.09	F <sub>(1,24)</sub> =1.17	F <sub>(1,24)</sub> =2.20	F <sub>(1,24)</sub> =0.79
mRNA MAGL (AU)	1.30±0.10	<b>124.2±4.07<sup>**</sup></b>	<b>104.5±3.36<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=7.70</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=6.78</b>	F <sub>(1,24)</sub> =3.45
WB CB1 (AU)	1.08±0.10	105.4±3.60	117.2±5.25	<b>F<sub>(1,24)</sub>=4.53</b>	F <sub>(1,24)</sub> =1.78	F <sub>(1,24)</sub> =1.26
WB NAPE (AU)	0.68±0.01	97.47±7.13	105.7±5.35	F <sub>(1,24)</sub> =0.21	F <sub>(1,24)</sub> =0.16	F <sub>(1,24)</sub> =0.77
WB FAAH (AU)	0.60±0.01	<b>126.3±7.81<sup>**</sup></b>	<b>94.34±4.80<sup>##</sup></b>	F <sub>(1,24)</sub> =2.52	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.88</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.31</b>
WB DAGL $\alpha$ (AU)	0.60±0.05	85.72±6.21	106.0±11.48	F <sub>(1,24)</sub> =0.29	F <sub>(1,24)</sub> =1.45	F <sub>(1,24)</sub> =1.14
WB MAGL (AU)	0.64±0.05	<b>135.5±5.91<sup>***</sup></b>	<b>106.7±5.13<sup>##</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=11.41</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.45</b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.21</b>
T-Maze (10seg)	79.6±8.32	<b>22.0±5.5<sup>***</sup></b>	<b>41.25±5.4<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=23.45</b>	F <sub>(1,24)</sub> =0.13	<b>F<sub>(1,24)</sub>=8.86</b>
T-Maze (40seg)	81.22±8.15	<b>29.33±6.6<sup>***</sup></b>	<b>57.7±5.40<sup>#</sup></b>	<b>F<sub>(1,24)</sub>=11.38</b>	F <sub>(1,24)</sub> =0.57	<b>F<sub>(1,24)</sub>=5.83</b>

Continuación Tabla Resumen 6. Resultados de los efectos de PALI en corteza prefrontal en un modelo de esquizofrenia por activación inmune prenatal. Expresión proteica y niveles de mRNA de los diversos parámetros estudiados, expresados en porcentaje, de los grupos tratados o no con paliperidona y expuestos a Poly(I:C) con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05 vs. Veh+PALI; ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Veh+Poly(I:C).

#### 4. ESTUDIO EN PACIENTES CON UN PRIMER EPISODIO PSICÓTICO.

En la primera publicación derivada del estudio “FLAMMPEPs” (García-Bueno, Bioque, MacDowell, Barcones et al., 2014a), se evidencia la existencia de un desequilibrio inflamatorio existente en los pacientes diagnosticados como primer episodio psicótico (PEP). Concretamente, se identificó un aumento significativo en alguno de los componentes intracelulares de la vía proinflamatoria (NFκB, iNOS, COX2), y una disminución de los antiinflamatorios (IκBα, 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPARγ) respecto a los controles.

En una segunda publicación, se estudió la misma cohorte de pacientes seis meses después para evaluar su evolución, y tratar de identificar posibles factores de riesgo o protectores asociados con la sintomatología de la enfermedad (García-Bueno, Bioque, MacDowell, Santabárbara et al., 2014b). Los resultados obtenidos no sólo mostraban la alteración en los componentes intracelulares del balance inflamatorio, sino que también algunos de los elementos solubles de la vía proinflamatoria estaban aumentados (PGE<sub>2</sub>, TBARS, Nitritos). Por otro lado, se observó una relación inversa entre la dosis de antipsicótico y los niveles de PGE<sub>2</sub>, mientras que con 15d-PGJ<sub>2</sub> la relación era directa.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados previos expuestos en esta Tesis Doctoral, se decidió hacer un sub-estudio en el seguimiento de la cohorte de pacientes con un primer episodio psicótico, para evaluar la acción de los tratamientos de Risperidona y Paliperidona respecto a otros antipsicóticos (tabla 14), en los diferentes marcadores biológicos evaluados.

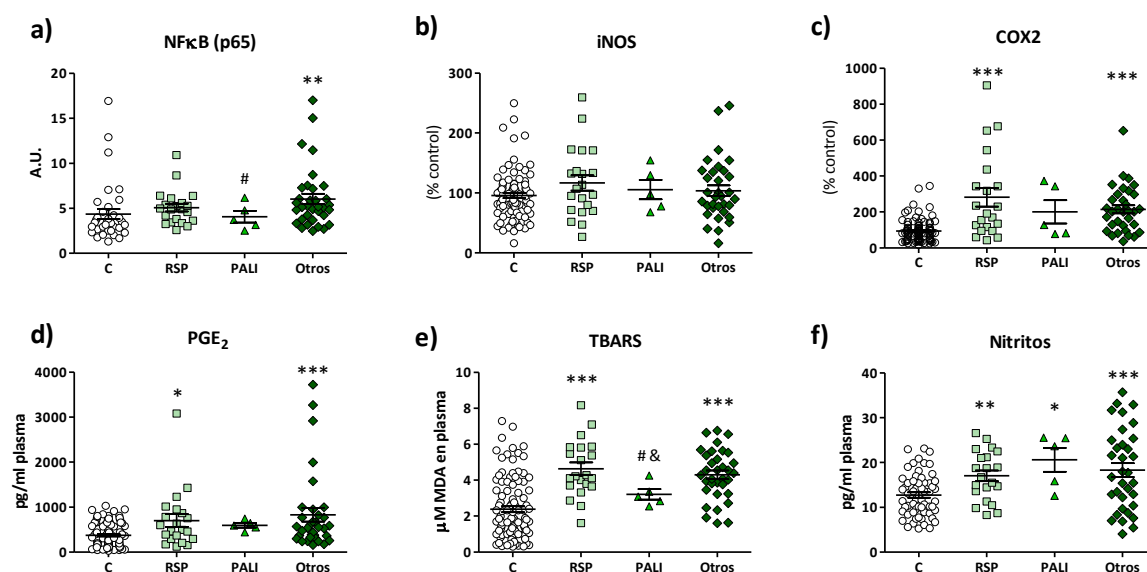
Las características de la muestra se resumen en la tabla 14.

Características	Controles (N=106)	Pacientes Basal (N=117)	Pacientes Seg. (N=85)
<b>Características Demográficas</b>			
Edad (años)	25.18 ± 6.79	23.91±5.83	25.21 ± 6.03
<b>Sexo (%)</b>			
Hombre	70 (66.0)	81 (69.2)	60 (70.6)
Mujer	36 (34.0)	36 (30.8)	25 (29.4)
<b>Historial Psiquiátrico</b>			
<b>Estado Socioeconómico</b>			
Alto	14 (13.2)	22 (18.8)	16 (18.8)
Medio-alto	17 (16.0)	12 (10.3)	7 (8.2)
Medio	54 (50.9)	48 (41)	30 (35.3)*
Medio-bajo	19 (17.9)	27 (23.1)	24 (28.2)
Bajo	2 (1.9)	8 (6.8)	8 (9.4)*
<b>Grupo Étnico</b>			
Caucásico	96 (90.6)	110 (94)	79 (92.9)
Gitano	0 (0)	1 (0.9)	1 (1.2)
Magrebí	2 (1.9)	1 (0.9)	1 (1.2)
Asiático	0 (0)	1 (0.9)	1 (1.2)
Caribeño	0 (0)	1 (0.9)	1 (1.2)
Hispanico	6 (5.7)	3 (2.6)	2 (2.4)
Otros	2 (1.9)	0	0 (0)
Edad en el episodio psicótico	-	24.37±5.92	24.37 ± 5.92

<b>Duración de la Psicosis sin tratar (DUP) - días</b>	-	98.02±114.38	68.58 ± 77.28
<b>Diagnóstico – no. (%)</b>			
<b>Psicosis afectiva</b>	-	21 (17.9)	17 (20.0)
<b>Psicosis no afectiva</b>	-	96 (82.1)	62 (72.9)
<b>Psicosis por drogas</b>	-	-	6 (7.1)
<b>Evaluación Psiquiátrica</b>			
<b>PANSS</b>			
<b>Total</b>	-	53.10±19.50	40.29 ± 23.67
<b>Positiva</b>	-	11.17±6.05	8.01 ± 5.03
<b>Negativa</b>	-	14.32±6.03	11.76 ± 8.15
<b>General</b>	-	27.62±10.07	20.52 ± 11.99
<b>YOUNG</b>	-	1.90±4.76	1.39 ± 3.57
<b>Montgomery-Asberg</b>		6.51±6.37	6.02 ± 6.94
<b>Escala de funcionamiento global (GAF)</b>	-	67.20±13.70	72.08 ± 17.23
<b>Medicación antipsicótica basal – no. (%)</b>			
<b>Risperidona</b>	-	43 (36.8)	21 (25.9)
<b>Olanzapina</b>	-	15 (12.8)	6 (7.4)
<b>Aripiprazol</b>	-	11 (9.4)	15 (18.5)
<b>Paliperidona</b>	-	9 (7.7)	5 (6.2)
<b>Clozapina</b>	-	8 (6.8)	6 (7.4)
<b>Quetiapina</b>	-	7 (6.0)	5 (6.2)
<b>Ziprasidona</b>	-	2 (1.7)	2 (2.5)
<b>Ninguna</b>	-	22 (18.8)	21 (25.9)
<b>Dosis diarias de equivalentes de clorpromazina – mg</b>	-	282.19±253.04	298.06 ± 303.16
<b>Uso de Litio – no. (%)</b>	-	10 (8.5)	7 (8.4)
<b>Índice de masa corporal</b>	23.14 ± 3.16	24.92±4.07	24.65 ± 5.73
<b>Uso de Cannabis - no. (%)</b>	14 (16.0)	31 (26.5)	4 (5.1)
<b>Uso de Cannabis por mes – no. cigarros</b>	1.15 ± 6.36	11.38±34.02	1.09 ± 6.37
<b>Uso Tabaco – no. (%)</b>	25 (29.4)	56 (57.7)	54 (65.1)
<b>Uso de Tabaco por mes – no. cigarros</b>	45.38 (119.31)	212.43±248.63	241.98 (254.11)
<b>Cotina (ng/ml)</b>	26.28±49.31	86.73±84.46	97.27±84.50

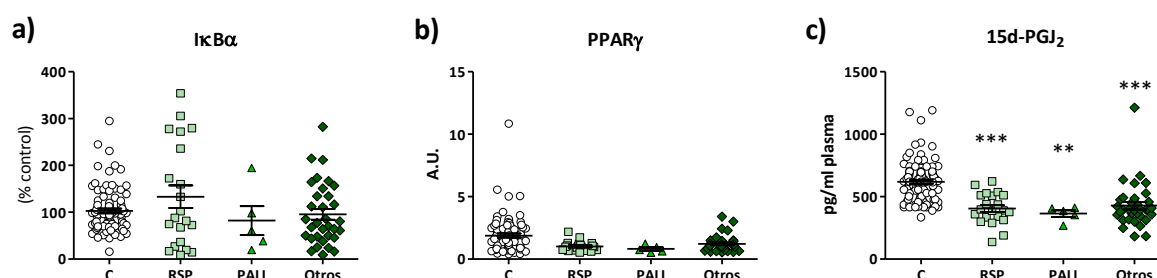
**Tabla 14.** Descripción demográfica y características clínicas de la muestra a tiempo basal y seguimiento.

Respecto a la vía proinflamatoria, se observó que el grupo de PEP tratados con otros antipsicóticos que no fuesen RSP o PALI presentaban un aumento significativo en los niveles de actividad de NFκB, mientras que PALI era capaz de prevenir dicho aumento y RSP no presentaba cambios respecto al grupo control (Fig.63a). Ninguno de los grupos estudiados presentó cambios en los niveles de iNOS (Fig.63b), pero sí se observó un aumento significativo en los niveles proteicos de COX2 en los grupos tratados con RSP y otros antipsicóticos (Fig.63c). Dicho cambio se mantiene en los niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub>, en donde ambos grupos muestras un aumento significativo, mientras que PALI no cambia respecto al grupo control (Fig.63d). El daño celular reflejado en los niveles de peroxidación lipídica se encuentra aumentado significativamente en los PEP tratados con RSP y otros antipsicóticos, en cambio el tratamiento con PALI previene el aumento de los niveles de peroxidación lipídica (Fig.63e). Por último, los tres grupos estudiados presentan un aumento significativo de los niveles plasmáticos de nitritos respecto al grupo control (Fig.63f).



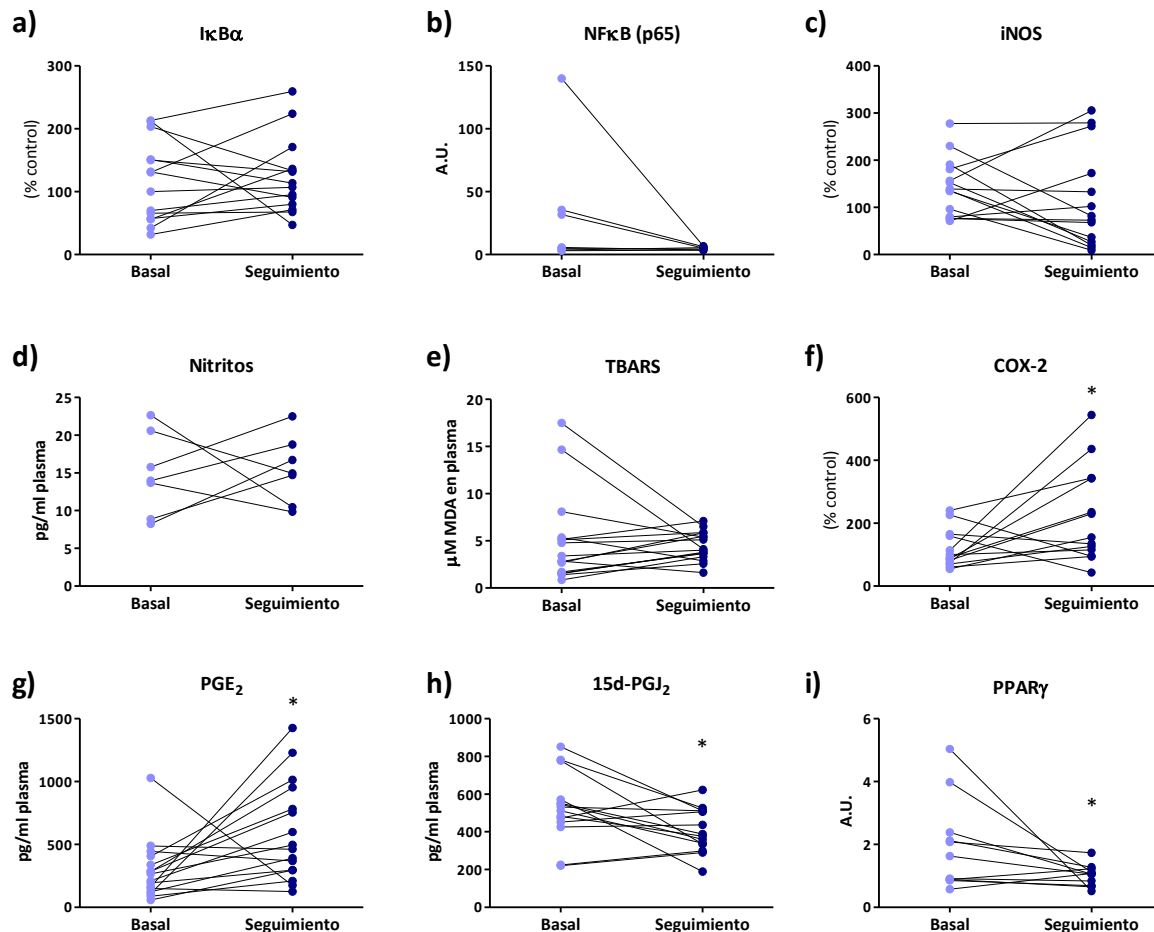
**Figura 63. Marcadores biológicos proinflamatorios.** Marcadores biológicos proinflamatorios en controles (C) y primeros episodios psicóticos tratados con Risperidona (RSP), paliperidona (PALI) u otros antipsicóticos (Otros). Niveles de actividad de NFκB en extracto nuclear de PBMC (a), niveles proteicos en de las enzimas iNOS y COX2 en extracto citoplasmático de PBMC (c,d), niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> (d), TBARS (e) y Nitritos (f). Los datos son representativos de la media ± EEM (controles n=85, RSP n=21, PALI n=5, Otros n=34). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. C; &p<0.05 vs. RSP; #p<0.05 vs. Otros. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls. Para las comparaciones entre PALI y RSP/Otros se usó el test no paramétrico de Mann-Whitney U.

En cuanto a la vía antiinflamatoria, no se observaron cambios en la subunidad inhibitoria de NFκB, IκBα, en ninguno de los grupos respecto al grupo control (Fig.64a). De igual manera, no se presentan cambios en los niveles de actividad de PPARγ en ninguno de los grupos (Fig.64b). Finalmente, la disminución de los niveles plasmáticos de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ<sub>2</sub> presente en el primer episodio psicótico no cambia con los tratamientos de antipsicóticos estudiados (Fig.64c).



**Figura 64. Marcadores biológicos antiinflamatorios.** Marcadores biológicos antiinflamatorios en controles (C) y primeros episodios psicóticos tratados con Risperidona (RSP), paliperidona (PALI) u otros antipsicóticos (Otros). Niveles proteicos de IκBα en extracto citoplasmático de PBMC (a), niveles de actividad de PPARγ en extracto nuclear de PBMC (b), niveles plasmáticos de 15d-PGJ<sub>2</sub>(c). Los datos son representativos de la media ± EEM (controles n=85, RSP n=21, PALI n=5, Otros n=34). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. C. ANOVA de una vía y post test de Newman-Keuls.

Al realizar un subanálisis de los pacientes que han sido tratados con RSP a lo largo del estudio, se pueden apreciar las diferencias en los parámetros biológicos evaluados al inicio del estudio respecto a su seguimiento (Fig.65). Por un lado, se observó un aumento significativo de los parámetros proinflamatorios COX-2 y PGE<sub>2</sub> en el seguimiento de los pacientes (Fig.65f, g), y por otro, una disminución significativa de los parámetros antiinflamatorios 15d-PGJ<sub>2</sub> y PPAR $\gamma$  en el seguimiento (Fig.65h, i).



**Figura 65. Marcadores biológicos pro/anti inflamatorios en pacientes PEPs tratados con RSP.** Marcadores biológicos inflamatorios en pacientes con un primer episodio psicótico tratados con Risperidona (RSP). Niveles proteicos de I $\kappa$ B $\alpha$  en extracto citosólico de PBMC (a), niveles de actividad de NF $\kappa$ B en extracto nuclear de PBMC (b), niveles proteicos de iNOS en extracto citosólico de PBMC (c), niveles plasmáticos de nitritos y TBARS (d, e), niveles proteicos de COX2 en extracto citosólico de PBMC (f), niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> y 15d-PGJ<sub>2</sub> (g, h) y niveles de actividad de PPAR $\gamma$  en extracto nuclear de PBMC (i). Los datos son representativos de la media  $\pm$  EEM (n=7-16). \*p<0.05 vs. Basal. t-test y post test de Wilcoxon.

#### 4.1 RESUMEN DE RESULTADOS:

Los resultados derivados del último bloque de experimentos, se sintetizan en las tablas resumen 7 y 8.

Parámetro	Valor Control	RSP	PALI	Otros
Actividad NFκB (AU)	4.36±0.55	5.07±0.42	<b>4.07±0.64<sup>#</sup></b>	<b>6.03±0.57**</b>
WB iNOS (AU; %)	1.19±0.2	116.6±12.82	105.5±16.15	103.6±8.93
WB COX2 (AU; %)	0.77±0.07	<b>282.0±51.76***</b>	200.6±65.06	<b>214.6±22.42***</b>
PGE <sub>2</sub> (pg/ml plasma)	373.3±25.98	<b>702.9±142.5*</b>	595.9±50.0	<b>828.7±150.2***</b>
TBARS (μM MDA)	2.38±0.16	<b>4.64±0.34***</b>	<b>3.21±0.29<sup>#&amp;</sup></b>	<b>4.29±0.23***</b>
Nitritos (pg/ml plasma)	12.75±0.59	<b>17.04±1.20**</b>	<b>20.60±2.69*</b>	<b>18.31±1.55***</b>
WB IκBα (AU; %)	0.37±0.04	133.3±24.2	82.23±30.98	95.56±11.49
Actividad PPARγ (AU)	1.88±0.15	1.01±0.08	0.81±0.12	1.22±0.11
15d-PGJ <sub>2</sub> (pg/ml plasma)	618.9±15.53	<b>404.7±27.39***</b>	<b>364.7±26.14**</b>	<b>427.6±30.95***</b>

**Tabla Resumen 7. Resultados de los efectos de los tratamientos con RSP/PALI en pacientes con un primer episodio psicótico (PEP).** Expresión proteica, niveles de actividad y niveles de marcadores solubles de los diversos parámetros estudiados, de los grupos tratados con RSP, PALI y Otros antipsicóticos con respecto al grupo control (expresados en unidades arbitrarias (AU), o según se indique). Test estadístico ANOVA de una vía con post test de Newman-Keuls y test no paramétrico de Mann-Whitney U. \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. Control; & p<0.05 vs. RSP; # p<0.05 vs Otros.

Parámetro	RSP (Basal)	RSP (Seguimiento)	n	p
Actividad NFκB (AU)	31.97±18.77	4.82±0.46	7	0.109
WB iNOS (AU; %)	142.7±16.61	113.8±27.87	14	0.295
WB COX2 (AU; %)	117.1±17.11	222.6±42.11	14	<b>0.047*</b>
PGE <sub>2</sub> (pg/ml plasma)	289.7±58.94	598.3±98.03	16	<b>0.014*</b>
TBARS (μM MDA)	4.95±1.19	4.43±0.38	16	0.660
Nitritos (pg/ml plasma)	14.82±2.05	15.42±1.68	7	0.687
WB IκBα (AU; %)	115.3±17.19	123.4±16.09	14	0.501
Actividad PPARγ (AU)	1.93±0.43	1.02±0.10	11	<b>0.042*</b>
15d-PGJ <sub>2</sub> (pg/ml plasma)	528.7±49.34	406.6±31.42	14	<b>0.041*</b>

**Tabla Resumen 8. Resultados de los efectos del tratamiento con RSP en pacientes con un primer episodio psicótico (PEP).** Expresión proteica, niveles de actividad y niveles de marcadores solubles de los diversos parámetros estudiados, de los grupos tratados con RSP. Test estadístico t-test con post-test de Wilcoxon. \*p<0.05 vs. Basal.





## **VI. Discusión**

- 1. MODULACIÓN DE RSP/PALI EN LA NEUROINFLAMACIÓN.**
- 2. EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.**
- 3. PAPEL DE LA PALIPERIDONA EN LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS ANTIINFLAMATORIOS/ANTIOXIDANTES.**
- 4. EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.**
- 5. DISCUSIÓN GLOBAL. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO, IDEAS DE FUTURO.**

## 1. MODULACIÓN DE RSP/PALI EN LA NEUROINFLAMACIÓN.

La inflamación es un complejo mecanismo coordinado, en el cual intervienen diversas células del sistema inmune, y donde a pesar de la existencia de la barrera hematoencefálica, el cerebro es capaz de responder a estímulos inflamatorios periféricos, desarrollando una respuesta inflamatoria local que dependiendo de su duración e intensidad puede llegar a producir cambios fisiológicos/comportamentales (letargia, fiebre, falta de apetito) conocidos en su conjunto como “*sickness behaviour*”, cuyo objetivo es el mantenimiento de la homeostasis previa al daño y la supervivencia del organismo (rev. en Allan y Rothwell, 2003). Si bien la inflamación es un mecanismo protector, su exceso en intensidad y duración, la vuelven nociva y puede formar parte de la fisiopatología de múltiples enfermedades, incluidas algunas neurológicas-neurodegenerativas (rev. en González-Scarano y Baltuch, 1999), y psiquiátricas (Dantzer et al., 2008).

Numerosos estudios han demostrado en modelos *in vitro*, *in vivo* y en pacientes con esquizofrenia u otros trastornos psiquiátricos, la presencia de un desequilibrio en los niveles de diversas citoquinas, frente al que algunos antipsicóticos como el haloperidol, la clozapina y la risperidona (RSP) presentan un efecto modulador (Sugino et al., 2009). Muy poco estudios han estudiado en profundidad y detalle los mecanismos moleculares inflamatorios asociados. El primer bloque de resultados expuestos en esta Tesis Doctoral, corresponde a los obtenidos en un modelo inflamatorio inducido por una dosis no endotóxica de LPS, en donde se busca determinar el mecanismo mediante el cual el antipsicótico atípico RSP/PALI produce su efecto modulador. Para ello nos centramos en uno de los principales mecanismos inflamatorios, el orquestado por NFκB. No sólo se realizó el estudio en el SNC, en la corteza prefrontal, sino que también se evaluó los posibles efectos a nivel periférico. Gran cantidad de los estudios previos que usan el LPS como agente estimulador de la respuesta inflamatoria, lo usan a dosis endotóxicas o letales, lo cual hace difícil extrapolar los resultados obtenidos a neuropatologías con inflamación moderada como en el caso de la esquizofrenia. De hecho, el *shock* séptico inducido en algunos modelos a menudo causa alteraciones en la cognición, el humor y el comportamiento

animal, debido principalmente a la acción de la liberación masiva de citoquinas (Czerniawski y Guzowski, 2014), lo cual no sucede en nuestro modelo.

Los resultados derivados del estudio en los modelos animales de neuroinflamación (inducidos por LPS o estrés) han corroborado que las dosis de los antipsicóticos utilizados previenen el aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ , así como el aumento de  $IL6$  e  $IFN\gamma$  frente a un estímulo estresante agudo, en corteza prefrontal. De igual manera, se observó en el modelo animal de esquizofrenia inducido por la activación inmune prenatal, un aumento en los niveles de mRNA de diversas citoquinas ( $TNF\alpha$ ,  $IL6$  e  $IFN\alpha$ ), que eran normalizados a niveles control al tratar los animales con PALI. El efecto antiinflamatorio frente al aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias inducidas por el LPS está ampliamente documentado (Sugino et al., 2009; Himmerich et al., 2011). Se observaron resultados similares en cultivos de PBMC de pacientes con esquizofrenia, estimulados con LPS y Poly(I:C), en donde RSP induce un aumento en los niveles de  $IL10$ , previene el aumento de los niveles de  $IFN\gamma$ , mientras que no altera los niveles de  $IL4$  (Al-Amin et al., 2013), lo que también concuerda con otros estudios realizados en pacientes con esquizofrenia y en PEP (Noto et al., 2014; Upthegrove et al., 2014), aunque en esta última línea sigue existiendo gran variabilidad de resultados según la gravedad y el momento de desarrollo de la enfermedad. En nuestros modelos animales, si bien los niveles de  $IL10$  en corteza prefrontal no variaban significativamente bajo ningún estímulo estresante, sí disminuían sus niveles de mRNA, los cuales eran reestablecidos por el tratamiento con PALI. De igual manera en el modelo animal de esquizofrenia se observó que PALI inducía un aumento en los niveles de mRNA de las citoquinas antiinflamatorias  $IL10$  y  $TGF\beta$  en corteza prefrontal respecto al grupo no tratado. Por otro lado, a nivel plasmático PALI indujo un aumento significativo de los niveles de  $IL10$  bajo ambas condiciones de estrés. Esto nos sugiere un efecto principal y sostenido a nivel periférico frente al estímulo estresante, que podría contribuir a la homeostasis en el cerebro.

El NF $\kappa$ B, como factor regulador central de la respuesta inflamatoria, es sensible a una gran variedad de estímulos, entre los que cabe destacar el aumento en los niveles de citoquinas. Hemos observado que tanto el LPS como el estrés y los miméticos

virales (ej. Poly(I:C)) inducen la activación de la vía del NFκB, estimulando el aumento no sólo de sus niveles proteicos en el núcleo, sino también un aumento en los niveles de su mRNA. A su vez, los niveles citoplasmáticos de la subunidad inhibitoria se encuentran disminuidos debido a la degradación que sufre con la finalidad de dejar libre NFκB. Este mismo estímulo es el que induce un aumento en sus niveles de mRNA en el caso de los animales expuestos a LPS. A diferencia de éstos, tanto bajo condiciones de estrés crónico como en el modelo animal de esquizofrenia el efecto fue contrario, con una disminución significativa de dichos niveles, lo cual podría sugerir un agotamiento de la respuesta antiinflamatoria de IκBα. Aun así, PALI es capaz de restablecer tanto los niveles de mRNA como los proteicos de IκBα. En el año 2009, Song y colaboradores observaron un aumento en los niveles de mRNA y de la actividad de NFκB en pacientes con esquizofrenia (*Song et al., 2009*), al mismo tiempo que se publicaron los resultados discutidos en este bloque, se publicó un estudio en modelo *in vitro* de células humanas TCD4+ en donde se observó que diversos antipsicóticos podían suprimir AKT/NFκB regulando de esa manera la diferenciación de poblaciones celulares de linfocitos T (*Chen et al., 2011*).

Por otro lado, ambos antipsicóticos inhibieron el aumento de las enzimas proinflamatorias inducibles iNOS y COX-2 (dependientes de NFκB), y el aumento de la prostaglandina proinflamatoria, PGE<sub>2</sub> (dependiente de COX-2) en los modelos animales de neuroinflamación. Sin embargo, en el modelo animal de esquizofrenia sólo se observó el aumento de iNOS, en cambio ni COX-2 ni las enzimas que dependen de ella (mPGES1 y L-PGDS) presentaron alteraciones. Previamente, Zhang y colaboradores en el 2010 demostraron que la administración crónica de antipsicóticos como el haloperidol y la RSP eran capaces de inducir una disfunción eréctil en ratas, debido a la inhibición de enzimas sintetas de óxido nítrico (NOS), en su forma endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) (*Zhang et al., 2010*). La disminución en los niveles de iNOS trae como consecuencia una menor cantidad de especies reactivas libres derivadas del nitrógeno principalmente, y por ende, una menor acumulación de dichas especies previene el daño celular, a diferencia de lo observado en el modelo neuroinflamatorio *per se*, en donde dicho daño se ve reflejado en la peroxidación de las membranas celulares, en nuestro caso, sólo la dosis mayor de ambos antipsicóticos previenen el aumento de los

niveles de peroxidación lipídica en el cerebro. Dicho efecto de PALI también se observó en el modelo animal de esquizofrenia.

Curiosamente, ambas dosis de antipsicóticos reestablecen el mecanismo antiinflamatorio compensatorio (L-PGDS/15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$ ) en los modelos de neuroinflamación. Dicho mecanismo es dependiente de la actividad de COX-2 (*García-Bueno et al., 2008b*), por lo que se puede dilucidar que los antipsicóticos modulan el proceso inflamatorio mediante acciones anti-proinflamatorias, mediante la prevención del aumento de parámetros pro-inflamatorios, y pro-antiinflamatorias, restaurando parámetros antiinflamatorios a niveles semejantes a los controles. Si bien en el modelo animal de esquizofrenia los mediadores dependientes de COX-2 no se encuentran alterados, PALI reestablece tanto la disminución de los niveles de mRNA como proteicos de PPAR $\gamma$ .

A nivel periférico se evaluaron algunos de los parámetros analizados en corteza prefrontal. En el modelo neuroinflamatorio inducido por LPS se observa que ambos antipsicóticos presentan efectos antiinflamatorios al prevenir el aumento de parámetros proinflamatorios y al promover el aumento de PPAR $\gamma$ . Sin embargo, también se observó que las dosis menores de ambos antipsicóticos presentaban un efecto más amplio que las dosis mayores, a diferencia de lo observado en corteza prefrontal, donde los efectos más potentes los presentaban las dosis mayores. Aún faltan evidencias claras que apoyen una mayor eficacia de las dosis bajas frente a otras mayores, o que al menos, indiquen una dosis óptima para su utilización en la clínica, pero hay estudios que apuntan a que tratamientos iniciales de dosis muy bajas presentan mayor ventaja en los pacientes que responden al tratamiento (*McGorry et al., 2011; Donnelly et al., 2013*), seguramente debido a la menor toxicidad, a la presencia de menos efectos adversos y extrapiramidales, y por ende, a una mayor adherencia al tratamiento. Por otro lado, en el modelo neuroinflamatorio inducido por estrés, el único parámetro que variaba significativamente era el aumento en los niveles de COX-2, los cuales eran normalizados por PALI, esto puede deberse a la naturaleza del estímulo inflamatorio, bastante más lábil que el LPS. Este suceso, que no sólo ocurre en la periferia sino que también en la corteza prefrontal, se ha propuesto como una posible diana terapéutica en los últimos años. Teniendo en cuenta la hipótesis

inflamatoria en la fisiopatología de la esquizofrenia, se han realizado diversos estudios clínicos en donde se utiliza como adyuvante inhibidores de COX-2 con esperanzadores resultados iniciales en las fases tempranas de la enfermedad (*Laan et al., 2010; Müller et al., 2010*), ya que no sólo se previene el aumento de la prostaglandina proinflamatoria PGE<sub>2</sub>, sino que también afecta la neurotransmisión glutamatérgica y el metabolismo del triptófano. Sin embargo, en etapas crónicas de la enfermedad los resultados son contradictorios (*Rappard y Müller, 2004; Nitta et al., 2013*), lo que podría deberse en parte a que la inhibición de la rama proinflamatoria de COX-2, también bloquea su vertiente antiinflamatoria, con lo cual el mecanismo compensatorio activado por 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$  será deficiente, que de por sí ya se encuentra disminuido en estos pacientes (*Martínez-Gras et al., 2011; García-Bueno et al., 2014a*). Además, 15d-PGJ<sub>2</sub> también activa otros mecanismos compensatorios de tipo antioxidante, como el dependiente del factor NRF2 (*Haskew-Layton et al., 2013*). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelo animal de esquizofrenia, donde COX-2 no se alteraba, se puede sugerir que al menos parte de la población de pacientes esquizofrénicos podría no tener alterada la vía de COX-2, por lo que no existiría beneficio alguno de dicha terapia adyuvante, y lo mismo podría explicar alguno de los resultados negativos de dichos ensayos clínicos. Por todo ello, es imprescindible la realización de estudios detallados de esta vía en pacientes esquizofrénicos con un historial médico de posible activación inmune prenatal, con la finalidad de confirmar lo observado en el modelo animal de esquizofrenia. Incluso, sería interesante realizar un estudio donde los pacientes estén estratificados en subgrupos clínicos según el perfil inflamatorio que presenten con la finalidad de evaluar posibles adyuvantes al tratamiento de antipsicóticos.

Curiosamente en el estudio con las muestras de pacientes con un primer episodio, los principales hallazgos apuntan a que el desequilibrio inflamatorio en favor de la activación de la vía proinflamatoria prevalece a pesar del tratamiento con RSP u otros antipsicóticos; si bien los tratados con PALI parecen normalizar algunos de los parámetros, se necesitan nuevos estudios debido a que el número de pacientes que integran dicho grupo es muy pequeño, por lo que cualquier resultado se puede poner en duda en base a la variabilidad clínica y al tamaño de la muestra. Teniendo en cuenta

que algunos de estos pacientes recibían más de un antipsicótico a la vez, se decidió hacer un subanálisis de evolución de los parámetros estudiados en los pacientes que estuviesen medicados sólo con RSP. Los resultados obtenidos evidenciaron que la vía de COX-2 se encontraba alterada al igual que la actividad de PPAR $\gamma$ ; el incremento de la inflamación durante el seguimiento se puede deber a que los antipsicóticos evaluados (RSP/PALI) no son capaces de revertir completamente la inflamación asociada con la enfermedad, teniendo en cuenta que en nuestra población de estudio son evidentes las alteraciones de la vía de COX-2, se podría justificar el uso de un adyuvante antiinflamatorio (*Sommer et al., 2012*). Por otro lado, en los últimos años, se ha atribuido al uso crónico de antipsicóticos, parte del efecto inflamatorio de la enfermedad. En nuestro caso al analizar la concentración de antipsicótico usado en cada grupo medido en equivalentes de clorpromazina, observamos que la cantidad consumida al inicio del primer episodio psicótico (305.78 mg) es menor que la observada en el seguimiento (407.89 mg). Lamentablemente, una importante limitación del estudio es que la colección de pacientes que ingresó, tenía medicación previa al momento de obtener las muestras basales, por lo que desconocemos si el posible efecto antiinflamatorio tiene lugar en las primeras fases de la enfermedad y el mayor desequilibrio observado en el seguimiento se debe a la tolerancia desarrollada frente al antipsicótico, o bien el efecto antiinflamatorio de RSP es tardío, lo cual podría observarse en el descenso de la actividad de NF $\kappa$ B.

En los últimos años se ha demostrado que los mecanismos compensatorios endógenos se ponen en marcha cuando el estímulo inflamatorio o inmune se presenta (*Serhan et al., 2007*). Uno de estos mecanismos es la activación de PPAR $\gamma$ , que actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y glucídico, procesos inflamatorios y la diferenciación celular (*Kapadia et al., 2008*). En un estudio previo de nuestro laboratorio, se observó que en pacientes con esquizofrenia crónicos con una duración media de 12 años, los niveles proteicos del receptor PPAR $\gamma$  y los de su ligando endógeno 15d-PGJ<sub>2</sub> se encontraban disminuidos (*Martínez-Gras et al., 2011*).

El proceso inflamatorio inducido por estrés también puede ser desencadenado mediante la activación del sistema inmune a través de sus receptores de inmunidad innata TLRs (Gárate *et al.*, 2013).

En resumen, los resultados aquí expuestos sugieren que tanto a nivel sistémico como a nivel del SNC los antipsicóticos RSP/PALI tienen un efecto antiinflamatorio en los modelos animales de neuroinflamación y esquizofrenia.

## **2. EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.**

Según nuestro conocimiento, los resultados discutidos en este apartado son los primeros que proveen evidencia que sustentan el rol regulador del antipsicótico paliperidona en la activación de la respuesta inmune a través de los receptores TLR3/4 y el consecuente proceso inflamatorio en corteza prefrontal de ratas frente a un estímulo estresante agudo o crónico inducido por la restricción del movimiento, o bien por una activación inmune prenatal. Un estudio más profundo de los posibles mecanismos implicados mostró que el pretratamiento con paliperidona modula la inflamación y disfunción intestinal, y por ende los niveles plasmáticos de LPS inducidos por el estrés. Además PALI previene la activación de la vía del TLR4 por ligandos endógenos inespecíficos como HSP70 y HMGB1, al menos bajo condiciones de estrés agudo. Por otro lado, también se demostró que paliperidona modula la inflamación inducida por la activación inmune prenatal en el modelo animal de esquizofrenia, previniendo la activación del TLR3.

Estos resultados concuerdan con los anteriormente comentados acerca de los efectos antiinflamatorios de estos antipsicóticos. No existe evidencia sobre la capacidad del antipsicótico para unirse al receptor TLR que genere la respuesta antiinflamatoria. En esta línea algunos autores han probado los efectos de diversos agonistas y antagonistas de receptores de neurotransmisores relacionados con el mecanismo de la paliperidona, y estos estudios demostraron que ketanserina (un antagonista de 5HT<sub>2</sub>) y prazosina (un antagonista  $\alpha_1$ ) tenían un efecto antiinflamatorio en un modelo neuroinflamatorio inducido por LPS (Sugino *et al.*, 2009). Se necesitaría



la realización de estudios que expliquen la manera en que la estructura química de la paliperidona puede afectar los TLRs, o como parece más factible, si el efecto es en realidad indirecto y se media por el bloqueo dopaminérgico o serotoninérgico. Por otro lado, Zhu y colaboradores identificaron algunas moléculas con la capacidad de modular la vía TLR3-IRF3 inhibiendo la señalización de PI3K, entre ellas la sertralina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina), trifluoperazina (antagonista D<sub>2</sub> y D<sub>1</sub>), flufenazina (antagonista D<sub>2</sub>) (Zhu *et al.*, 2010).

Nuestros resultados adquieren especial relevancia al considerar que se han encontrado alteraciones en la vía de los TLRs a nivel periférico en pacientes con esquizofrenia (McKernan *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2012). Además, existe evidencia de alteraciones en los marcadores de patrones de traslocación bacteriana en pacientes con esquizofrenia, lo cual puede estar relacionado con una activación del sistema inmune a través de la estimulación de los TLRs (Severance *et al.*, 2013). Estudios recientes, llevados a cabo en nuestro grupo (en proceso de publicación), indican un aumento de la expresión de TLR4 en la periferia y en cerebros post-mortem de pacientes con esquizofrenia. De todas formas, el nexo directo entre la disfunción de la barrea intestinal, la traslocación bacteriana y la activación de la vía del TLR4 aún no se ha demostrado en pacientes que padecen alguna enfermedad neuropsiquiátrica.

Bajo nuestras condiciones de estrés, el tratamiento con paliperidona produce un efecto antiinflamatorio a nivel gastrointestinal. Dicho hallazgo necesita un estudio más profundo, debido a que frecuentemente los pacientes con esquizofrenia presentan problemas intestinales. Cabe mencionar que el síndrome del colon irritable es común entre las personas que sufren enfermedades psiquiátricas (Wei y Hemmings, 2005). Incluso algunos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad psiquiátrica se relacionan con el sistema gastrointestinal, como la hipersensibilidad al gluten o a la caseína, o la infección por *Toxoplasma gondii* (Dickerson *et al.*, 2010; Severance *et al.*, 2013). Basados en esta evidencia, la condición de la función y estructura intestinal es un factor que se debe tener en cuenta en los futuros estudios farmacológicos y fisiopatológicos de la esquizofrenia, aunque también se deben tener en consideración las alteraciones metabólicas producidas por algunos antipsicóticos como elemento confusor. Un ejemplo de esto, se observa en los tratamientos crónicos de olanzapina

administrados a ratas, donde se altera la microbiota intestinal y se induce un aumento de peso asociado al desarrollo del síndrome metabólico (*Davey et al., 2013*).

Otras moléculas potencialmente reguladoras del TLR4 moduladas por paliperidona, especialmente bajo condiciones de estrés, son HSP70 y HMGB1. La HSP70 es una chaperona implicada, entre otras, en el neurodesarrollo y la neuroprotección; su producción defectuosa causada por el estrés durante el neurodesarrollo puede participar de la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas (*Bates et al., 1996*). Incluso se han asociado polimorfismos entre el gen de HSP70 y variantes clínicas de esquizofrenia (*Kim et al., 2008; Pae et al., 2009*), y dicha correlación también se ha observado en PEP y pacientes esquizofrénicos sin tratar (*Bozidis et al., 2014*). Resultados previos ya habían demostrado que RSP y haloperidol presentaban un efecto inhibitorio en el aumento de HSP70 en células de glioma tratadas con MK-801 (antagonista NMDA) (*Roh et al., 2008*). Otros autores han encontrado diferencias en los niveles de anticuerpos contra HSP60/70 en pacientes esquizofrénicos (*Kim et al., 2001*). Por otro lado, la habilidad de PALI para inducir el aumento de los niveles de mRNA de HSP70 bajo condiciones de estrés crónico puede relacionarse con su efecto neuroprotector, lo cual merece mayor investigación al respecto. Aunque esta activación también podría considerarse como un mecanismo de respuesta del SNC en contra de la administración crónica de PALI, en esta línea, algunos autores han demostrado que un co-inductor de las HSP, el BGP-15, previene los efectos metabólicos derivados del uso de antipsicóticos (*Literáti-Nagy et al., 2012*).

HMGB1 es una proteína que se une a la cromatina para facilitar la transcripción de genes envueltos en los procesos de crecimiento de neuritas y migración celular (*rev. en Thomas y Travers, 2001*). También se le reconoce como una señal de daño, capaz de inducir la activación del TLR4, y del TLR3 cuando está unida a dsRNA (*Yang et al., 2010; Crews et al., 2013*). Por otro lado, HMGB1 también es secretada por los macrófagos activados durante procesos inflamatorios (*Wang et al., 1999*). Teniendo en cuenta que muchos autores consideran la esquizofrenia como una patología del neurodesarrollo con un componente inflamatorio, el efecto regulador de PALI frente la inducción del aumento de los niveles de HMGB1 bajo condiciones de estrés, la hacen una potencial diana terapéutica, sobre todo considerando que su expresión se relaciona con el

deterioro de la memoria, la neurodegeneración crónica y la progresión de la neuroinflamación (Fang et al., 2012).

Bajo nuestras condiciones experimentales, el modelo animal de esquizofrenia inducido por la infección prenatal con Poly(I:C) presentó un aumento en los niveles de mRNA de TLR3 y TRIF, y además se observó un aumento en los niveles proteicos de TLR3, TRIF y la fosforilación del factor de transcripción nuclear IRF3 en corteza prefrontal. Dichas alteraciones son restauradas tras la administración crónica de PALI.

Una ventaja importante de este modelo animal de esquizofrenia es que al igual que en el modelo de movilidad restringida, se desarrolla “*sickness behavior*” con síntomas endocrinos, autonómicos y de comportamiento inducido por las citoquinas proinflamatorias secretadas ante la activación inmune (Cunningham et al., 2007).

Se ha observado, que el tratamiento con RSP mejora las alteraciones en la neurogénesis hipocampal, la expresión de parvalbúmina y la vascularización inducidas por la infección prenatal con Poly(I:C) (Piontkewitz et al., 2012). Por otro lado, se ha determinado que el tratamiento con clozapina revierte el deterioro de la sincronía neuronal entre el hipocampo y la corteza prefrontal medial, un déficit observado en este modelo animal que se asocia con la aparición del comportamiento esquizoide (rev. en Dickerson y Bilkey, 2013). Además, se ha descubierto que dosis bajas de PALI y RSP pueden restaurar la hipofunción de los receptores NMDA presentes en el modelo de infección prenatal, de igual manera que previenen el aumento de glutamato extracelular inducido por MK-801 (Roenker et al., 2011).

Si bien algunos estudios previos demostraron el efecto protector de RSP frente al desarrollo de alteraciones estructurales en el cerebro de modelos animales expuestos a activación inmune prenatal, al administrar el tratamiento durante la fase asintomática (Piontkewitz et al., 2011), en nuestro caso, PALI demuestra su efecto protector ante el daño cognitivo propio de estos animales.

Se ha observado que altas dosis de Poly(I:C) inducen la síntesis de interferones de tipo I, necesarios para el desarrollo de la respuesta inmune antiviral (Alsharifi et al., 2005), que al unirse a sus receptores activan la vía de señalización de STAT1,

induciendo la síntesis de elementos de respuesta con actividad antiviral. Entre ellos, la síntesis de la enzima limitante del metabolismo del triptófano, indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (*Suh et al., 2007*), la cual se ha relacionado con la neuroinflamación desarrollada en la esquizofrenia. En pacientes con esquizofrenia se han detectado altos niveles de ácido quinurénico, el cual induce una hiperactividad de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica (*Erhardt y Engberg, 2002*). Además, el exceso de ácido quinurénico inhibe los receptores NMDA (*Müller et al., 2011*), lo cual se ha relacionado principalmente con los déficits cognitivos que sufren dichos pacientes.

La modulación que realizan los antipsicóticos respecto al perfil de citoquinas en la esquizofrenia, desemboca en la atenuación de la respuesta inflamatoria Th1, pero en pacientes con PEP también se ha observado que se puede atenuar la respuesta Th2 en favor de una respuesta inmuno-moduladora, caracterizada por el aumento en los niveles de TGF $\beta$  (*Borovcanin et al., 2013*).

En resumen, los resultados aquí expuestos sugieren que algunos de los efectos neuroprotectores de PALI se relacionan con la habilidad de regular las alteraciones inducidas por el estrés o la activación inmune prenatal, mediante la modulación del sistema inmune innato.

### **3. PAPEL DE LA PALIPERIDONA EN LOS MECANISMOS COMPENSATORIOS ANTIINFLAMATORIOS/ANTIOXIDANTES.**

Gran cantidad de evidencia sugiere que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la fisiopatología de la esquizofrenia. Tanto los altos niveles de radicales libres como el déficit en los sistemas antioxidantes aportan al desarrollo del estrés oxidativo contribuyendo a la enfermedad (*Kulak et al., 2013*). Se ha observado que compuestos con actividad antioxidante son capaces de atenuar la hiperlocomoción en ratones tratados con PCP, e incluso atenuar los déficits de inhibición prepulso a altas dosis (*Shirai et al., 2012*), lo cual los convierte en potenciales blancos terapéuticos como adyuvantes en el tratamiento de la enfermedad.

El factor de transcripción nuclear NRF2 regula una de las principales vías antioxidantes. Bajo condiciones normales, la vía antioxidante puede ser activada por múltiples elementos, uno de ellos son las quinasas, en este caso la activación de

PI3K/AKT, la cual induciría un cambio conformacional en KEAP1, la proteína inhibidora de NRF2, y este último quedaría libre y traslocaría al núcleo para inducir la transcripción de genes de enzimas antioxidantes. Bajo condiciones de estrés agudo, AKT presenta un aumento en sus niveles de fosforilación, pero curiosamente no se alteraron los niveles de NRF2 en el núcleo, e incluso los niveles citoplasmáticos de KEAP1 se encuentran elevados. Además no se observaron alteraciones en los niveles de mRNA de las enzimas antioxidantes reguladas por NRF2. Sin embargo, el tratamiento con PALI restableció los niveles proteicos de KEAP1 en el citoplasma, lo que produjo un aumento en los niveles nucleares de NRF2. Por otro lado, una vez en el núcleo NRF2 indujo la transcripción de genes de enzimas antioxidantes, entre ellos, NQO1, SOD, GPx y Catalasa. Además, indujo un aumento en los niveles de mRNA de KEAP1, lo cual podría deberse al mecanismo regulatorio de la vía, en donde KEAP1 ingresa al núcleo para desplazar NRF2 nuevamente hacia el citoplasma. Recientemente, se ha descrito que bajo condiciones de estrés agudo KEAP1 aumenta en citoplasma (*Djordjevic et al., 2015*), por lo que gran parte de NRF2 secuestrado por KEAP1 podría estar sometido a ubiquitinización para su posterior degradación (*Kobayashi et al., 2004*).

Cuando los animales se expusieron a estrés crónico, se observó que la vía de activación PI3K/AKT estaba parcialmente bloqueada, a pesar de que los niveles de PI3K estaban significativamente disminuidos, y los niveles de fosforilación de AKT estaban aumentados, lo que puede deberse a que múltiples señales pueden activar AKT (*Mahajan et al., 2012*). En este caso no se observaron alteraciones ni en los niveles de mRNA ni proteicos de KEAP1, pero sí una disminución en los niveles de mRNA y proteicos de NRF2 en el núcleo; asociado a estas alteraciones se observó una disminución en los niveles de mRNA de las enzimas HO1, SOD y Catalasa. Por su parte, el tratamiento con PALI reestablece los niveles de PI3K y de NRF2 en el núcleo, al igual que los niveles de mRNA de las enzimas alteradas.

La vía del NRF2 también se estudió en el modelo animal de esquizofrenia. La mayoría de los cambios observados en los modelos de estrés no se aprecian en este modelo, pero la administración crónica de PALI indujo un aumento en los niveles y la actividad nuclear del factor NRF2, lo cual conllevó principalmente un aumento de los niveles de mRNA de hemo oxigenasa 1 (HO1) y el restablecimiento de los niveles de

SOD. HO1 es una enzima con propiedades tanto antioxidantes como antiinflamatorias, ya que puede regular el efecto antiinflamatorio de IL10 y viceversa (*Lee y Chau, 2002; Naito et al., 2014*).

Estos resultados nos sugieren que PALI estimula la activación de la vía del NRF2. En este sentido, tienen importancia otros elementos de la respuesta inflamatoria que son capaces de regular NRF2. NFκB regula negativamente la vía: se ha observado que NFκB tiene sitios de unión en la región promotora del gen de NRF2 (*Nair et al., 2008*), e incluso la subunidad p65 puede inhibir la vía mediante la privación de la proteína de unión CREB o reclutando la histona deacetilasa 3 (HDAC3), un co-represor de los elementos de respuesta antioxidante (*Liu et al., 2008*). Por otro lado, 15d-PGJ<sub>2</sub> regula positivamente la vía del NRF2 al poder inducir directamente el cambio conformacional en KEAP1 para dejar libre a NRF2 (*Oh et al., 2008*). Otra molécula capaz de modular positivamente esta vía es la quimioquina fractalquina (CX3Cl1) (*Lastres-Becker et al., 2014*). Dichas vías podrían estar implicadas al menos en parte en los efectos aquí descritos.

Otro mecanismo compensatorio importante que recientemente se ha implicado en la esquizofrenia es la polarización microglial. Este mecanismo está en estrecha relación con los niveles de citoquinas presentes en el ambiente, es de esta manera que frente a citoquinas proinflamatorias y estímulos como LPS, IFNγ y TNFα entre otros, la microglía en reposo polariza hacia un fenotipo proinflamatorio (M1); cuando se activan los mecanismos reguladores induciendo la síntesis de otras citoquinas como IL4, IL13, IL10, TGFβ, entre otras, dicha polarización cambia hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2). La identificación precisa de estos estados en la microglía es compleja debido a la plasticidad de estas células, capaces de modificar su funcionamiento según el ambiente en que este inmersa. Dentro de los escasos marcadores propuestos para su estudio se encuentra Arginasa I (ArgI), y en los últimos años se ha propuesto el receptor de folato 2 (FOLR2) como marcador de macrófagos antiinflamatorios (*Tsuneyoshi et al., 2012*).

Nosotros hemos observado que bajo condiciones de estrés agudo, existe un aumento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias, por lo que no se observan cambios en los niveles proteicos de los marcadores M2, pero también se induce un aumento de IL4, lo cual puede ser la causa del aumento de los niveles de mRNA de

FOLR2 a pesar de no observarse un posterior cambio a nivel proteico. Por su parte el tratamiento con PALI previno el aumento de las citoquinas proinflamatorias y normalizó la disminución de las antiinflamatorias, además, indujo un aumento en los niveles de mRNA y proteico de ambos marcadores M2. Estos cambios fueron confirmados mediante inmunofluorescencia, en donde hemos demostrado que aumentaba el número de células microgliales que expresaban tanto Arg1 como FOLR2. De todas formas, es necesaria la realización de estudios más profundos que confirmen estos resultados no sólo en modelos animales, sino también en humanos, ya sea evaluando la activación de los macrófagos en sangre periférica o el estado de la microglía en cerebros *postmortem*.

En cambio, bajo condiciones de estrés crónico se mantiene el aumento de algunas de las citoquinas proinflamatorias, pero tanto IL4 como IL10 se encuentran disminuidos, lo cual puede explicar el descenso en los niveles de Arg1. Estas alteraciones fueron normalizadas mediante el tratamiento con PALI.

Por último, en el modelo de esquizofrenia inducido por la infección prenatal, se induce el aumento de las principales citoquinas proinflamatorias, pero no se observan alteraciones en las antiinflamatorias. Sin embargo, los niveles proteicos de los marcadores M2, Arg1 y FOLR2, se encuentran disminuidos. Ante el tratamiento con PALI los niveles de citoquinas proinflamatorias se reestablecen, mientras que las antiinflamatorias aumentan, al igual que los niveles de Arg1 y FOLR2. El efecto del aumento de las citoquinas antiinflamatorias puede deberse en parte a la polarización antiinflamatoria de esta microglía, ya que para mantener dicha polarización y poder suprimir la respuesta inflamatoria secreta citoquinas antiinflamatorias como IL10, pero también a la acción de HO1 implicada en la regulación positiva de IL10 (Naito *et al.*, 2014).

Nuestros resultados respecto a la polarización de la microglía hacia un perfil antiinflamatorio M2 están en concordancia con un estudio anterior (Roman *et al.*, 2012) en el cual se administró una mezcla de RSP y fluoxetina a ratas que posteriormente fueron sometidas a un test de natación forzada. El análisis de los macrófagos intraperitoneales y de la pleura, posteriormente cultivados, demostró un aumento en los niveles de Arg1 en las ratas tratadas. Si bien los autores atribuyen el aumento al antidepressivo, no se debe desestimar el efecto inmunomodulador de RSP.

Por otro lado, recientemente se ha observado que en modelos animales inflamatorios de uveítis autoinmune (EAU) y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) los macrófagos activados expresan FOLR2 en las áreas de inflamación, y que tratamientos dependientes de FOLR2, en este caso, el EC0746 (un conjugado antiinflamatorio derivado del ácido fólico) atenuaba los cambios histopatológicos progresivos de la inflamación (*Lu et al., 2014*)

Por otro lado, el folato es una vitamina hidrosoluble del complejo de vitaminas B, la cual se ha observado que mejora los síntomas negativos de la esquizofrenia; incluso aberraciones en su metabolismo se relacionan con el aumento de riesgo en desarrollar el síndrome metabólico en aquellos pacientes que usan antipsicóticos atípicos (*rev. en Burghardt y Ellingrod, 2013*). Además, en enfermedades psiquiátricas como el autismo y la esquizofrenia se han detectado autoanticuerpos contra el receptor de folato (*Frye et al., 2013; Ramaekers et al., 2014*).

En resumen, los resultados aquí expuestos sugieren que PALI podría modular el sistema antioxidante, no sólo disminuyendo indirectamente los niveles de radicales libres derivados de la respuesta inflamatoria, sino que también mediante la estimulación de la vía del NRF2. Además, mediante la inducción de enzimas antiinflamatorias y la activación de NRF2, estaría contribuyendo a la polarización microglial antiinflamatoria M2.

#### **4. EFECTO DE LA PALIPERIDONA EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (ECS).**

Nuestros resultados apoyan la idea de que los antipsicóticos atípicos son capaces de modular las alteraciones del ECS inducidas por el estrés, aunque de todas formas es necesaria la realización de futuros estudios para dilucidar su beneficio terapéutico. Por otro lado, nuestros resultados también sugieren la posibilidad de que el amplio rango de alteraciones en el ECS descritos en la esquizofrenia se pueda deber a la medicación antipsicótica crónica. Este posible factor confusor puede ser uno de los causantes de la gran variabilidad de alteraciones descritas en el ECS (*Ferretjans et al., 2012*). Una de las implicaciones inmediatas es la importancia del estudio del ECS en pacientes con enfermedades psiquiátricas sin tratamiento antipsicótico.

Los resultados obtenidos nos sugieren que el ECS reacciona ante la exposición a estrés (*Crowe et al., 2014*). Algunos autores han encontrado que los efectos del estrés



en la señalización del ECS en el cerebro está mediada por el receptor glucocorticoide (Hill *et al.*, 2011). El uso de modelos animales basados en el estrés es relevante en el estudio de posibles mecanismos implicados en la fisiopatología del estrés. Incluso, gran parte de los modelos animales usados para el estudio de la depresión se basan en la exposición a estrés crónico. Además, muchos de los antipsicóticos atípicos son usados como adyuvantes en el tratamiento de depresiones resistentes a antidepresivos y en el estrés post-traumático (Rogoz, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Las alteraciones encontradas en esta serie de estudios, dependen principalmente de la presencia o ausencia de estrés, pero también de la duración del estímulo. Las ratas expuestas a estrés agudo que no recibieron el tratamiento con PALI mantuvieron los niveles expresión de los receptores CB1/CB2 sin alterar, pero disminuyó la expresión proteica nuclear del receptor PPAR $\alpha$ . Además, se observó un aumento en los niveles de mRNA de las enzimas de degradación FAAH y MAGL, al igual que un aumento en los niveles proteicos de FAAH, mientras que las enzimas de síntesis no sufrieron cambios a nivel de la corteza prefrontal, pero sí se observó una disminución en los niveles de DAGL a nivel periférico en PBMC. Estos resultados sugieren que el estrés agudo disminuye la disponibilidad de endocannabinoides, pero también podría corresponder a una respuesta coordinada como mecanismo regulador a la liberación de AEA y 2-AG durante el inicio de la exposición a estrés. Dicho incremento del tono de eCB está ampliamente descrito por otros autores frente al estímulo de estrés agudo y subcrónico (Gorzalka y Hill, 2011; Dlugos *et al.*, 2012) y podría depender de la liberación de dopamina y/o glutamato inducido por el estrés, con la finalidad de inhibir la sobreactivación del eje HHA inducido por el estrés (Patel *et al.*, 2003). En esta línea, se ha descubierto que RSP protege contra las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica inducida por estrés (Krishnamurthy *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista terapéutico, PALI aumenta los niveles de CB1, y la expresión de las enzimas de síntesis de eCB NAPE y DAGL $\alpha$ , esta última también a nivel periférico, y además previene el incremento de los niveles de FAAH. Estos cambios se pueden considerar como un intento de normalizar los niveles de eCB. Puede que el resultado del incremento en los niveles de AEA y 2AG sea la causa del aumento de los receptores CB1 y TRPV1 en los animales tratados con PALI bajo condiciones de estrés agudo (rev. en Ross, 2003). Recientemente, hemos observado

una disminución en los niveles de CB2, NAPE y DAGL $\alpha$ , y por otro lado un aumento en las principales enzimas de degradación de eCB, FAAH y MAGL en PBMCs de pacientes con un primer episodio psicótico (*Bioque et al., 2013*). Estos resultados podrían sugerir un decaimiento en los niveles de eCB o al menos de la disponibilidad de ellos durante un episodio psicótico, e incluso podría representar un mecanismo de respuesta frente a la síntesis y liberación previa de eCB. Es por ello que cobra importancia el rol normalizador que posee PALI en nuestro modelo animal.

Bajo condiciones de estrés crónico, también se produjeron cambios específicos en los componentes del ECS. En primer lugar, se observó en la corteza prefrontal, una disminución en los niveles de mRNA de los principales receptores, CB1 y CB2, lo cual está en concordancia con estudios anteriores, donde en modelos de estrés crónico o de administración crónica de corticosterona se había presenciado la disminución en los niveles de CB1 (*Hong et al., 2011; Hu et al., 2011; Xing et al., 2011; Bowles et al., 2012*). Incluso se ha observado que los ratones deficientes de CB1 presentan un comportamiento de tipo depresivo (*Valverde y Torrens, 2012*). Similares resultados se obtienen al administrar antagonistas de CB1 (*Beyer et al., 2010*), aunque también se ha observado el efecto contrario en modelos animales expuestos a estrés crónico no predecible (*McLaughlin et al., 2013*). Luego, en cuanto a las enzimas de degradación de los eCB se observó una disminución de FAAH tanto a nivel de mRNA como de expresión proteica, y de igual manera se apreció una disminución en los niveles proteicos de MAGL. En cuanto a las enzimas de síntesis, se apreció una disminución en los niveles de mRNA de DAGL $\alpha$ , pero curiosamente a nivel periférico se observa un aumento en los niveles proteicos de DAGL $\alpha$ . Algunos autores que usaron el mismo modelo animal de estímulo repetitivo durante 10 días, encontraron un aumento en los niveles de 2-AG, mientras que al mismo tiempo AEA se encontraba reducida (*Patel et al., 2009*). De todas formas nuestros resultados a 21 días de estrés pueden ser consecuencia o respuesta frente al estímulo, lo cual es difícil de determinar, teniendo en cuenta la gran reactividad del ECS en relación a la duración del estrés.

Por último, en el modelo animal de esquizofrenia inducido por infección prenatal encontramos que existe un aumento en los niveles de mRNA y de expresión proteica de las enzimas de degradación FAAH y MAGL en la corteza prefrontal, y que PALI tiene la capacidad de normalizar dichas alteraciones. Lo cual, nuevamente nos sugiere la

disminución del tono endocannabinoide o bien un mecanismo regulador en respuesta a la liberación de AEA y 2-AG frente a estímulos previos.

En vista de estos resultados, es necesario realizar futuros estudios incluyendo un curso temporal de los niveles de endocannabinoides en estos animales, fundamental para comprender la dinámica del sistema endocannabinoide y su interacción con paliperidona. De la misma manera es necesario estudiar con mayor profundidad posibles mecanismos reguladores no sólo en los modelos animales sino también en pacientes con esquizofrenia o psicosis.

La mayoría de los estudios realizados en modelos animales relacionados con el efecto de algunos antipsicóticos se centran en la actividad del receptor CB1 en áreas cerebrales específicas como estriado y corteza prefrontal (*McPartland et al., 2014*). Además, se han detectado polimorfismos en el gen del receptor CB1, CNR1, los cuales pueden actuar como un factor protector frente a la esquizofrenia, o bien inducir una mejor respuesta farmacológica a los antipsicóticos atípicos (*Fernández-Espejo et al., 2009*). Por otro lado, PALI es capaz de regular PPAR $\alpha$ , receptor que es activado por PEA y OEA, y que recientemente ha sido relacionado con la modulación de la actividad de células dopaminérgicas a través de los receptores nicotínicos, lo cual podría ser relevante para el tratamiento de enfermedades psíquicas (*Melis et al., 2013*). Además, PALI también regula la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de OEA y PEA, las cuales se han propuesto como parte del mecanismo homeostático de neuroprotección en diversas patologías del SNC relacionadas con el estrés (*Fidaleo et al., 2014*).

Finalmente, cabe mencionar que el ECS parece jugar un papel importante en la polarización M1/M2 de la microglía. Se ha observado que el receptor CB2 tiene una expresión disminuida en la microglía en reposo, pero que aumenta substancialmente cuando se activa hacia el fenotipo M2. También se ha comprobado que ante la administración de 2-AG se incrementa la activación microglial M2 en modelos de encefalomiелitis autoinmune (*Lourbopoulos et al., 2011*). En esta misma línea, se ha observado que la inhibición de la enzima de degradación de 2-AG, MAGL, en modelos animales de Parkinson aumenta el número de células microgliales que secretan la citoquina antiinflamatoria TGF $\beta$  en ciertas áreas cerebrales como el estriado y en la *substantia nigra pars compacta* (*Fernández-Suárez et al., 2014*). También se ha

sugerido que el aumento de los niveles de AEA induce que la microglía M1 pase a una polarización M2; de hecho la administración de PF3845, un inhibidor de FAAH, en modelos animales de daño cerebral suprime la expresión de iNOS y COX-2, y aumenta la expresión de Arginasa 1, marcador de M2 (*Tchantchou et al., 2014*).

Aún queda mucho para dilucidar la relevancia de las alteraciones en el ECS que participan en la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas, y determinar si son causa o consecuencia de la enfermedad.

En resumen, los resultados aquí expuestos sugieren que PALI podría modular al menos parcialmente la maquinaria del sistema endocannabinoide, lo cual podría presentar una posible nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de algunos de los cuadros clínicos de la esquizofrenia.

## **5. DISCUSIÓN GLOBAL. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO, IDEAS DE FUTURO.**

Si bien la esquizofrenia se considera una patología neuropsiquiátrica caracterizada por alteraciones en la función dopaminérgica, el potencial regulador de paliperidona frente al sistema inmune y la respuesta inflamatoria a nivel del SNC pueden ser fundamentales para explicar los beneficios terapéuticos en el uso del tratamiento de la esquizofrenia, más allá de sus acciones sobre la neurotransmisión por dopamina y serotonina.

A lo largo de los estudios en los diversos modelos animales, hemos puesto en evidencia la acción moduladora de RSP/PALI en la respuesta inflamatoria. El uso de modelos animales basados en el estrés es relevante para el estudio de posibles mecanismos relacionados con la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas, ya que es uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo y progresión de estas enfermedades en sus múltiples manifestaciones clínicas (*rev. en Bradley y Dinan, 2010*). De hecho, la exposición a estrés está presente en casi todos los desórdenes psiquiátricos, y su efecto sobre el sistema inmune/endocrino debe ser estudiado y controlado (*García-Bueno et al., 2008; Serretti y Fabbri, 2013*). Por otro lado, el uso del modelo animal de esquizofrenia que mejor representa esta enfermedad tan compleja y propiamente humana, nos ha permitido mediante el uso de dosis farmacológicas

muy bajas, confirmar nuestros hallazgos previos y además, correlacionarlos con una normalización en el comportamiento. Al mismo tiempo, hemos podido estudiar posibles nuevas estrategias terapéuticas como el sistema antioxidante coordinado por NRF2, la polarización microglial M1/M2 y el sistema endocannabinoide.

El renovado interés en los cambios inmune-inflamatorios y su asociación con las consecuencias oxido/nitrosativas como mecanismo clave en la fisiopatología de la esquizofrenia nos encamina hacia nuevas estrategias terapéuticas. En particular, la gran cantidad de evidencia que se acumula de los modelos animales que apoyan el papel de la activación inmune prenatal y el estrés oxido/nitrosativo sugiere que se puede desembocar en un daño en el neurodesarrollo y alteraciones en el comportamiento (*rev. en Venkatasubramanian y Debnath, 2013*). Los receptores Toll-like estarían participando en las alteraciones del sistema inmune, con lo que algunos de los enfoques farmacológicos actuales tratan de hacer frente a estos procesos, sobre todo mediante tratamientos con antioxidantes y antiinflamatorios como adyuvantes de los antipsicóticos (*Sommer et al., 2013*).

Nuestros resultados apoyan la idea de que algunos de los efectos neuroprotectores que ofrecen los antipsicóticos aquí estudiados, pueden estar relacionados con su capacidad de regular las alteraciones inducidas por el estrés mediante la modulación del sistema inmune innato y la respuesta inflamatoria, pero se necesita una investigación más profunda para determinar el alcance de estas posibles terapias en las diferentes fases de la enfermedad psiquiátrica, y en especial de la esquizofrenia. Sobre todo, si la modulación farmacológica de los mecanismos moleculares que regulan la neuroinflamación son dependientes de TLR-4 (traslocación de bacterias Gram- de origen intestinal, DAMPS) o dependientes de TLR-3, ya que no debemos olvidar que estos receptores de inmunidad innata son la primera línea de defensa inespecífica frente a procesos infecciosos.

En la necesidad de encontrar nuevas dianas o estrategias terapéuticas, la modulación de la vía antioxidante NRF2, y la polarización de la microglía M1/M2 a primera vista son muy atractivos. Sin embargo, no debemos olvidar la cantidad de procesos fisiológicos que necesitan de fuentes de radicales libres para el recambio

celular y la resolución de procesos inflamatorios, entre otros. En esta misma línea es importante tener en cuenta que una de las funciones por las que se caracterizan los macrófagos (y la microglía) que polarizan hacia el perfil M2 es la inmunoregulación y por ende la inmunotolerancia, y esta característica contribuye a la progresión de tumores (*Puig-Kröger et al., 2019*). Si bien los estudios epidemiológicos sugieren que los pacientes con enfermedades mentales como la esquizofrenia, tienen una menor probabilidad de desarrollar algunos tipos de cáncer, debido a que existe un solapamiento en la regulación génica entre ambas enfermedades, es decir, genes implicados en los desórdenes mentales están regulados positivamente mientras que en los tumores la regulación de los mismos genes es inversa (*Ibañez et al., 2014*), para muchos esta comorbilidad inversa es un factor protector frente al desarrollo de tumores. De todas formas, la posible participación de la polarización M2 en la supervivencia de pacientes con cáncer y esquizofrenia no se puede descartar, debido a la complejidad de ambas enfermedades y a la variedad de factores que en ellas participan. Por otro lado, estos macrófagos infiltran el tejido adiposo, jugando un papel importante en el desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes tipo II.

Los resultados expuestos en esta tesis nos enseñan una visión integradora de la respuesta inflamatoria tanto a nivel periférico como a nivel del cerebro, en el contexto de la enfermedad psiquiátrica. Sin embargo, existen importantes limitaciones en algunos de los mecanismos y de las acciones aquí propuestos para RSP/PALI, como el desconocimiento de los efectos sobre los niveles de endocannabinoides y la falta de test comportamentales en los modelos animales de neuroinflamación inducido por estrés que nos hubiesen aportado interesante información al correlacionar las distintas vías estudiadas. De igual manera en el modelo animal de esquizofrenia hubiese sido interesante comprobar el estado inflamatorio a nivel periférico, pero sobre todo las mayores limitaciones las encontramos al momento de trabajar con muestras humanas. Lamentablemente, obtener una colección de muestras suficientes sin tratamiento previo es muy difícil, en nuestro caso, la gran mayoría de los pacientes con un primer episodio psicótico estaban con tratamiento desde hace uno a tres meses. Además, si bien el reclutamiento se centró en una población de primeros episodios psicóticos, se debe destacar que en la práctica psiquiátrica un primer episodio psicótico no sólo se

refiere a la primera vez que la persona sufre un episodio de psicosis, sino que también contempla una ventana de tiempo de hasta seis meses desde el suceso, lo que también hay que agregar que debido a la falta de respuesta ante el tratamiento y el surgimiento de efectos secundarios, el tratamiento con antipsicóticos inicial se solía modificar con el transcurso del proyecto, con lo cual el número de muestras de nuestro subestudio disminuyó considerablemente. Si bien para comprobar el estado inflamatorio de los pacientes con un primer episodio psicótico, nuestra población de estudio era válida, sin patologías previas y clínicamente controlada (principal objetivo del proyecto), para observar los posibles efectos beneficiosos de los antipsicóticos en la inflamación no lo era tanto. Seguramente, sometiendo estos resultados a modelos estadísticos más complejos se podrían obtener resultados interesantes al respecto, pero al perder la variabilidad de este grupo de muestras, nos quita representatividad de la población de estudio.

En conclusión, teniendo en cuenta el conjunto de datos expuestos, tanto la inhibición del sistema inmune innato como la modulación de la respuesta inflamatoria parecen ser clave en el mecanismo de acción de los antipsicóticos atípicos aquí estudiados. Esto, junto con las posibles dianas farmacológicas propuestas, justifican la necesidad de más y mayores estudios traslacionales que nos ayuden en la comprensión de la esquizofrenia y de los mecanismos farmacológicos usados en su tratamiento.



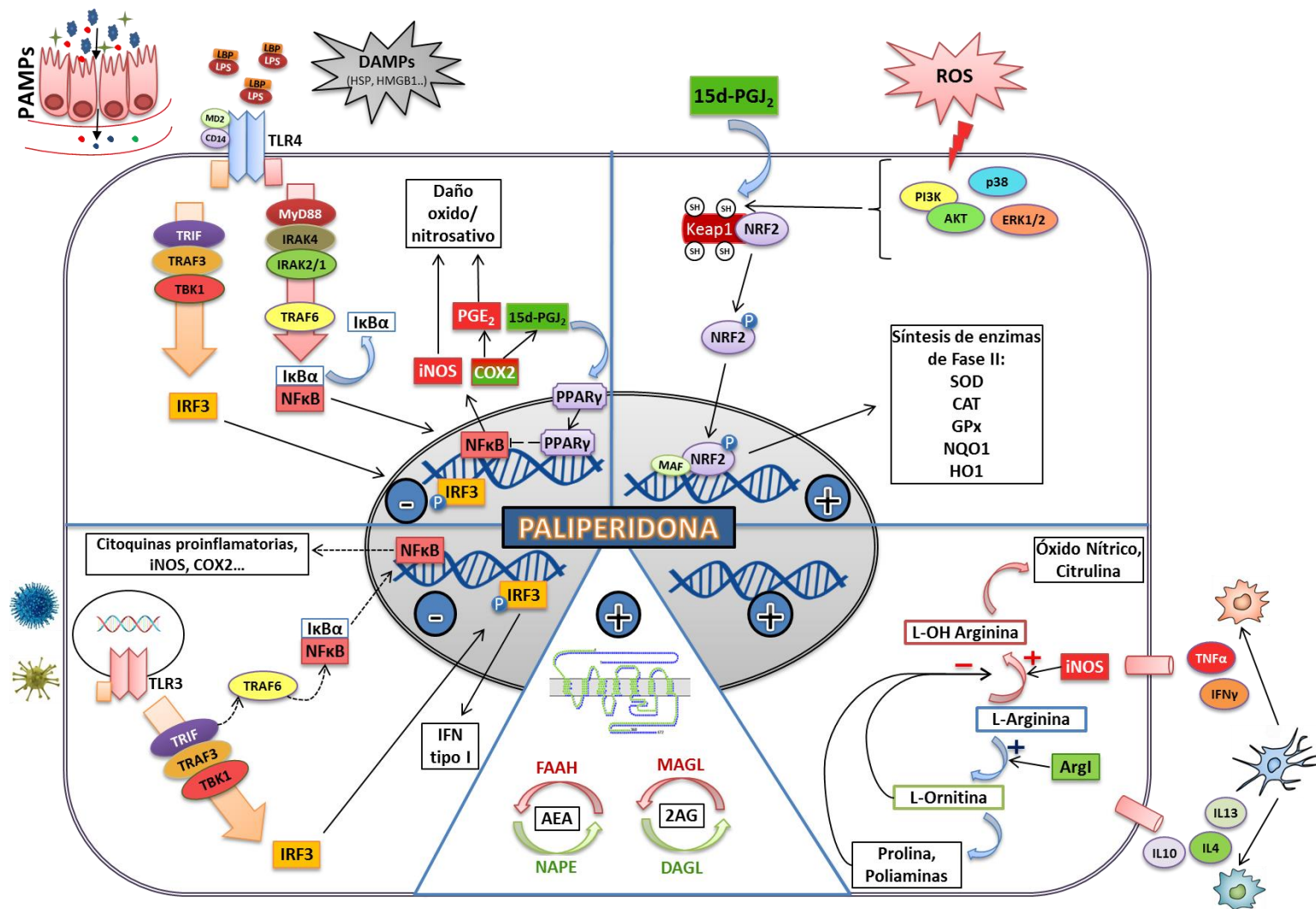




## VII. Conclusiones

## 1. Conclusiones.

1. Risperidona y Paliperidona normalizan el incremento de parámetros proinflamatorios inducidos en los modelos animales de neuroinflamación y esquizofrenia tanto a nivel periférico como en corteza prefrontal de rata.
2. Risperidona y Paliperidona restauran los parámetros antiinflamatorios disminuidos en los modelos animales de neuroinflamación y esquizofrenia en la corteza prefrontal de rata, y además, aumentan los niveles de IL10 en plasma en los modelos de neuroinflamación inducido por estrés.
3. Risperidona y Paliperidona disminuyen el daño oxidativo/nitrosativo inducido en los modelos animales de neuroinflamación y de esquizofrenia.
4. Paliperidona inhibe la activación de la vía del TLR4 en corteza prefrontal inducida por la exposición a protocolos de estrés, al igual que inhibe el aumento en la permeabilidad intestinal y la consiguiente traslocación bacteriana inducida por el estrés.
5. Paliperidona inhibe la activación de la vía del TLR3 en corteza prefrontal de ratones inducida por el agonista Poly(I:C).
6. Paliperidona induce la activación de la vía antioxidante regulada por NRF2 tanto en los modelos animales de neuroinflamación como en el de esquizofrenia.
7. Paliperidona induce la expresión de un ambiente de citoquinas inmuno-reguladoras, que podrían contribuir a la polarización antiinflamatoria M2 de la microglía en los modelos animales de neuroinflamación y esquizofrenia.
8. Paliperidona modula las alteraciones inducidas en el sistema endocannabinoide en los modelos animales de neuroinflamación y esquizofrenia.
9. Paliperidona mejora los déficits de cognitivos inducidos en el modelo animal de esquizofrenia por la activación inmune prenatal.
10. Risperidona no es capaz de inhibir el aumento de los parámetros proinflamatorios en los pacientes con un primer episodio psicótico. Paliperidona normaliza parcialmente algunos de los parámetros proinflamatorios (NFκB, TBARS) en pacientes con un primer episodio psicótico.



**Figura 66.** Esquema representativo de los mecanismos en donde interfiere paliperidona. (-) corresponde a inhibición y (+) corresponde a estimulación.





## VIII. Bibliografía

## 1. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackerman KD, Heyman R, Rabin BS, Anderson BP, Houck PR, Frank E, Baum A (2002) Stressful life events precede exacerbations of multiple sclerosis. *Psychosom Med.* 64:916-20.
2. Akhondzadeh S, Tabatabaee M, Amini H, Ahmadi Abhari SA, Abbasi SH, Behnam B (2007) Celecoxib as adjunctive therapy in schizophrenia: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Schizophr Res.* 90:179-85.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
4. Al'Abadie MS, Kent GG, Gawkrödger DJ (1994) The relationship between stress and the onset and exacerbation of psoriasis and other skin conditions. *Br J Dermatol.* 130:199-203.
5. Al-Amin MM, Nasir Uddin MM, Mahmud Reza H (2013) Effects of antipsychotics on the inflammatory response system of patients with schizophrenia in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 11:144-51.
6. Alexander JK, Hillier A, Smith RM, Tivarus ME, Beversdorf DQ (2007) Beta-adrenergic modulation of cognitive flexibility during stress. *J. Cogn. Neurosci.* 19:468-78.
7. Allan SM, Rothwell NJ (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358:1669–77.
8. Alsharifi M, Lobigs M, Regner M, Lee E, Koskinen A, Müllbacher A (2005) Type I interferons trigger systemic, partial lymphocyte activation in response to viral infection. *J Immunol.* 175:4635-40.
9. Alvarez-Jiménez M, Parker AG, Hetrick SE, McGorry PD, Gleeson JF (2011) Preventing the second episode: a systematic review and meta-analysis of psychosocial and pharmacological trials in first-episode psychosis. *Schizophr Bull.* 37:619-30.
10. Ambrosini A, Louin G, Croci N, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M (2005) Characterization of a rat model to study acute neuroinflammation on histopathological, biochemical and functional outcomes. *J Neurosci Methods.* 144:183-91.
11. Arango Duque G, Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 5:491.
12. Ashton JC, Glass M (2007) The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuroparmacol.* 5:73-80.
13. Ballesteros A, Summerfelt A, Du X, Jiang P, Chiappelli J, Tagamets M, O'Donnell P, Kochunov P, Hong LE (2013) Electrophysiological intermediate biomarkers for oxidative stress in schizophrenia. *Clin Neurophysiol.* 124:2209-15.
14. Bates PR, Hawkins A, Mahadik SP, McGrath JJ (1996) Heat stress lipids and schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 55:101–107.
15. Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Judd F, Katz F, Katz P, Ording-Jespersen S, Little J, Conus P, Cuenod M, Do KQ, Bush AI (2008) N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia--a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry.* 64:361-8.
16. Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, Chan K, Manners MT, Samad TA, Kennedy JD, Bingham B, Whiteside GT (2010) Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis.* 39:148-55.

17. Bhargava A, Meijer OC, Dallman MF, Pearce D (2000) Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. *J Neurosci.* 20:3129-38.
18. Bhojraj TS, Francis AN, Montrose DM, Keshavan MS (2010) Grey matter and cognitive deficits in young relatives of schizophrenia patients. *Neuroimage.* 54:S287—S292.
19. Bioque M, García-Bueno B, Macdowell KS, Meseguer A, Saiz PA, Parellada M, Gonzalez-Pinto A, Rodriguez-Jimenez R, Lobo A, Leza JC, Bernardo M (2013) Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 38:2568-77.
20. Bitanhirwe BK, Woo TU (2011) Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 35:878-93.
21. Black PH, Garbutt LD (2002) Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res.* 52:1-23.
22. Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem.Biol.* 14:1347-56.
23. Borçoi AR, Patti CL, Zanin KA, Hollais AW, Santos-Baldaia R, Ceccon LM, Berro LF, Wuosilva R, Grapiglia SB, Ribeiro LT, Lopes-Silva LB, Frussa-Filho R (2015) Effects of prenatal immune activation on amphetamine-induced addictive behaviors: Contributions from animal models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 63:63-9.
24. Borovcanin M, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic Dejanovic S, Stefanovic V, Arsenijevic N, Lukic ML (2013) Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. *Schizophr Res.* 147:103-9.
25. Bowles NP, Hill MN, Bhagat SM, Karatsoreos IN, Hillard CJ, McEwen BS (2012) Chronic, noninvasive glucocorticoid administration suppresses limbic endocannabinoid signaling in mice. *Neuroscience.* 204:83-9.
26. Bozidis P, Hyphantis T, Mantas C, Sotiropoulou M, Antypa N, Andreoulakis E, Serretti A, Mavreas V, Antoniou K. (2014) HSP70 polymorphisms in first psychotic episode drug-naïve schizophrenic patients. *Life Sci.* 100:133-7.
27. Bradley AJ, Dinan TG (2010) A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *J Psychopharmacol.* 24:91-118.
28. Brambilla P, Bellani M, Isola M, Bergami A, Marinelli V, Dusi N, Rambaldelli G, Tansella M, Finardi AM, Martino G, Perlini C, Furlan R (2014) Increased M1/decreased M2 signature and signs of Th1/Th2 shift in chronic patients with bipolar disorder, but not in those with schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 4:e406.
29. Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr, Liu L, Babulas VP, Susser ES (2005) Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry.* 162:767-73.
30. Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M (2011) TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res.* 90:417-27.
31. Burghardt KJ, Ellingrod VL. (2013) Detection of the Metabolic Syndrome in Schizophrenia and Implications for Antipsychotic Therapy: Is There a Role for Folate? *Mol Diagn Ther.* 17:21-30.
32. Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB (2007) Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res.* 97:51-9.

33. Cannon WA (1914) The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researches. *Am. J. Psychology*. 7:673-84.
34. Cannon WA (1915) Bodily Changes in pain, hunger, fear and rage. Applegate and Co. New York, London.
35. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 9:917-24.
36. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation*. 115:1599- 608.
37. Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T (1996) Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med*. 183:311-6.
38. Chen ML, Tsai TC, Lin YY, Tsai YM, Wang LK, Lee MC, Tsai FM (2011) Antipsychotic drugs suppress the AKT/NF- $\kappa$ B pathway and regulate the differentiation of T-cell subsets. *Immunol Lett*. 140:81-91.
39. Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A (2008) Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol*. 5:466-75.
40. Choi YK, Moran-Gates T, Gardner MP, Tarazi FI (2010) Effects of repeated risperidone exposure on serotonin receptor subtypes in developing rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 20:187-94.
41. Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D, Insel TR, Daar AS; Scientific Advisory Board and the Executive Committee of the Grand Challenges on Global Mental Health et al. (2011) Grand challenges in global mental health. *Nature*. 475:27-30.
42. Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*. 60:236-48.
43. Corena-McLeod Mdel P, Oliveros A, Charlesworth C, Madden B, Liang YQ, Boules M, Shaw A, Williams K, Richelson E. (2008) Paliperidone as a mood stabilizer: a pre-frontal cortex syn- aptoneurosomal proteomics comparison with lithium and valproic acid after chronic treatment reveals similarities in protein expression. *Brain Res* 1233:8–19.
44. Correa F, Hernangómez M, Mestre L, Loria F, Spagnolo A, Docagne F, Di Marzo V, Guaza C (2010) Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*. 58:135-47.
45. Creese I, Burt DR, Snyder SH (1975) Dopamine receptor binding: differentiation of agonist and antagonist states with 3H-dopamine and 3H-haloperidol. *Life Sci*. 17:933-1001.
46. Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, Zou J (2013) High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*. 73:602–12.
47. Crowe MS, Nass SR, Gabella KM, Kinsey SG (2014) The endocannabinoid system modulates stress, emotionality, and inflammation. *Brain Behav Immun*. 42:1-5.
48. Cunningham C, Champion S, Teeling J, Felton L, Perry VH (2007) The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun*. 21:490-502.



49. Czerniawski J, Guzowski JF (2014) Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. *J Neurosci.* 34:12470-80.
50. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9:46-56.
51. Das NP, Ratty AK (1987) Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, and codeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol.* 37:258-64.
52. Davey KJ, Cotter PD, O'Sullivan O, Crispie F, Dinan TG, Cryan JF, O'Mahony SM (2013) Antipsychotics and the gut microbiome: olanzapine-induced metabolic dysfunction is attenuated by antibiotic administration in the rat. *Transl Psychiatry.* 3:e309.
53. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA (2013) Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio.* 4:e00264-13.
54. Deacon RM, Bannerman DM, Kirby BP, Croucher A, Rawlins JN (2002) Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav. Brain Res.* 133:57-68.
55. Deacon RM, Penny C, Rawlins JN (2003) Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav. Brain Res.* 139:139-55.
56. Deleidi M, Hallett PJ, Koprach JB, Chung CY, Isacson O (2010) The Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid triggers nigrostriatal dopaminergic degeneration. *J Neurosci.* 30:16091-101.
57. Dember WN, Richman CL (1989) Spontaneous Alternation Behavior (Springer, New York)
58. De Miranda J, Yaddanapudi K, Hornig M, Villar G, Serge R, Lipkin WI (2010) Induction of Toll-like receptor 3-mediated immunity during gestation inhibits cortical neurogenesis and causes behavioral disturbances. *MBio.* pii: e00176-10.
59. Deslauriers J, Larouche A, Sarret P, Grignon S (2013) Combination of prenatal immune challenge and restraint stress affects prepulse inhibition and dopaminergic/GABAergic markers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 45:156-64.
60. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258:1946-49.
61. Dhabhar FS (2014) Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res.* 58:193-210.
62. Dickerson DD, Bilkey DK (2013) Aberrant neural synchrony in the maternal immune activation model: using translatable measures to explore targeted interventions. *Front Behav Neurosci.* 7:217.
63. Dickerson F, Stallings C, Origoni A, Vaughan C, Khushalani S, Leister F, Yang S, Krivogorsky B, Alaedini A, Yolken R (2010) Markers of gluten sensitivity and celiac disease in recent onset psychosis and multi-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 68:100-4.
64. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Mitic M, Lukic I, Radojcic MB (2015) Alterations in the Nrf2-Keap1 signaling pathway and its downstream target genes in rat brain under stress. *Brain Res.* 1602:20-31.

65. Dlugos A, Childs E, Stuhr KL, Hillard CJ, de Wit H (2012) Acute stress increases circulating anandamide and other N-acyl ethanolamines in healthy humans. *Neuropsychopharmacology*. 37:2416-27.
66. Do KQ, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M (2009) Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol*. 19:220-30.
67. Donnelly L, Rathbone J, Adams CE (2013) Haloperidol dose for the acute phase of schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev*. 8:CD001951.
68. Drechsler Y, Dolganiuc, Norkina L, Romics W, Li K, Kodys FH, Bach P, Mandrekar G, Szabo J (2006) Heme Oxygenase-1 Mediates the Anti-Inflammatory Effects of Acute Alcohol on IL-10 Induction Involving p38 MAPK Activation in Monocytes. *Immunol*. 177:2592–600.
69. Dremencov E, ElMansari M, Blier P (2007a) Distinct electrophysiological effects of paliperidone and risperidone on the firing activity of rat serotonin and norepinephrine neurons. *Psychopharmacology (Berl)*. 194:63-72.
70. Dremencov E, ElMansari M, Blier P (2007b) Noradrenergic augmentation of escitalopram response by risperidone: electrophysiologic studies in the rat brain. *Biol Psychiatry*. 61:671-8.
71. Drexhage RC, van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Padmos RC, van Beveren N, Cohen D, Versnel MA, Nolen WA, Drexhage HA (2010) Inflammatory gene expression in monocytes of patients with schizophrenia: overlap and difference with bipolar disorder. A study in naturalistically treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13:1369-81.
72. Duncko R, Johnson L, Merikangas K, Grillon C (2009) Working memory performance after acute exposure to the cold pressor stress in healthy volunteers. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 91:377-81.
73. Dusi N, Perlini C, Bellani M, Brambilla P (2012) Searching for psychosocial endophenotypes in schizophrenia: the innovative role of brain imaging. *Riv Psichiatr*. 47:76-88.
74. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*. 80:1298-307.
75. Eggan SM, Hashimoto T, Lewis DA (2008) Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry*. 65:772-84.
76. Emiliani FE, Sedlak TW, Sawa A (2014) Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old history. *Curr Opin Psychiatry*. 27:185-90.
77. Endicott J, Spitzer RL, Fleiss JL, Cohen J (1976) The global assessment scale. A procedure for measuring overall severity of psychiatric disturbance. *Arch Gen Psychiatry*. 33:766-71.
78. Erhardt S, Engberg G (2002) Increased phasic activity of dopaminergic neurones in the rat ventral tegmental area following pharmacologically elevated levels of endogenous kynurenic acid. *Acta Physiol Scand*. 175:45-53.
79. Eyles D, Feldon J, Meyer U (2012) Schizophrenia: do all roads lead to dopamine or is this where they start? Evidence from two epidemiologically informed developmental rodent models. *Transl Psychiatry*. 2:e81
80. Fagerlund R, Kinnunen L, Köhler M, Julkunen I, Melén K (2005) NF- $\kappa$ B is transported into the nucleus by importin  $\alpha$ 3 and importin  $\alpha$ 4. *J Biol Chem*. 280:15942-51.
81. Fang P, Schachner M, Shen YQ (2012) HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Mol Neurobiol*. 45:499-506.

82. Farokhnia M, Azarkolah A, Adinehfar F, Khodaie-Ardakani MR, Hosseini SM, Yekehtaz H, Tabrizi M, Rezaei F, Salehi B, Sadeghi SM, Moghadam M, Gharibi F, Mirshafiee O, Akhondzadeh S (2013) N-acetylcysteine as an adjunct to risperidone for treatment of negative symptoms in patients with chronic schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Neuropsychopharmacol.* 36:185-92.
83. Farrelly L, Föcking M, Piontkewitz Y, Dicker P, English J, Wynne K, Cannon M, Cagney G, Cotter DR (2015) Maternal immune activation induces changes in myelin and metabolic proteins, some of which can be prevented with risperidone in adolescence. *Dev Neurosci.* 37:43-55.
84. Fatemi SH, Folsom TD (2009) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull.* 35:528-48.
85. Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Núñez L, Ellenbroek BA, Rodriguez de Fonseca F (2009) Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 206:531-49.
86. Fernández-Suárez D, Celorrio M, Riezu-Boj JI, Ugarte A, Pacheco R, González H, Oyarzabal J, Hillard CJ, Franco R, Aymerich MS (2014) The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model. *Neurobiol Aging.* 35:2603-16.
87. Ferretjans R, Moreira FA, Teixeira AL, Salgado JV (2012) The endocannabinoid system and its role in schizophrenia: a systematic review of the literature. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 34:S163-S177.
88. Fidaleo M, Fanelli F, Ceru MP, Moreno S (2014) Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and its lipid ligands. *Curr Med Chem.* 21:2803-21.
89. Forrest CM, Khalil OS, Pizarro M, Smith RA, Darlington LG, Stone TW (2012) Prenatal activation of Toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring. *Mol Brain.* 5:22.
90. Fraguas D, Gonzalez-Pinto A, Micó JA, Reig S, Parellada M, Martínez-Cengotitabengoa M, Castro-Fornieles J, Rapado-Castro M, Baeza I, Janssen J, Desco M, Leza JC, Arango C (2012) Decreased glutathione levels predict loss of brain volume in children and adolescents with first-episode psychosis in a two-year longitudinal study. *Schizophr Res.* 137:58-65.
91. Frank MG, Watkins LR, Maier SF (2013) Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. *Brain Behav Immun.* 33:1-6.
92. Frye RE, Sequeira JM, Quadros EV, James SJ, Rossignol DA. (2013) Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 18:369-81.
93. Fukuda T, Hisadome M, Komatsu H (2005) Treatment with Y-40138, a multiple cytokine production modulator, inhibits lipopolysaccharide or tumour necrosis factor- $\alpha$ - induced production of pro-inflammatory cytokines and augments interleukin-10. *J Pharm Pharmacol.* 57:1461-6.
94. Fumagalli S, Perego C, Ortolano F, De Simoni MG (2013) CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. *Glia.* 6:827-42.
95. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Bravo L, Berrocoso E, Caso JR, Micó JA, Leza JC (2011) Origin and consequences of brain toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation.* 8:151.

96. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, Micó JA, Leza JC (2013) Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry*. 73:32-43.
97. Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gómez-Lus ML, Leza JC (2014) Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *J Neuroinflammation*. 11:8.
98. García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC (2005a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry*. 57:885-94.
99. García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC (2005b) The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 180:513-22.
100. García-Bueno B, Madrigal JL, Pérez-Nievas BG, Leza JC (2008a) Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation after stress in rats. *Endocrinology*. 149:1969-78.
101. García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. (2008b) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci & Biobehav Rev*. 32:1136-51.
102. García-Bueno B, Bioque M, Mac-Dowell KS, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L, Rodríguez-Jiménez R, Sáiz PA, Castro C, Lafuente A, Santabárbara J, González-Pinto A, Parellada M, Rubio G, García-Portilla MP, Micó JA, Bernardo M, Leza JC (2014a) Pro-/anti-inflammatory dysregulation in patients with first episode of psychosis: toward an integrative inflammatory hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 40:376-87.
103. García-Bueno B, Bioque M, MacDowell KS, Santabárbara J, Martínez-Cengotitabengoa M, Moreno C, Sáiz PA, Berrocoso E, Gassó P, Fe Barcones M, González-Pinto A, Parellada M, Bobes J, Micó JA, Bernardo M, Leza JC (2014b) Pro-/antiinflammatory dysregulation in early psychosis: results from a 1-year follow-up study. *Int J Neuropsychopharmacol*. 31:8(2).
104. Garcia-Gutierrez MS, Perez-Ortiz JM, Gutierrez-Adan A, Manzanares J (2010) Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br.J.Pharmacol*. 160:1773-84.
105. Gardner DM, Murphy AL, O'Donnell H, Centorrino F, Baldessarini RJ (2010) International consensus study of antipsychotic dosing. *Am J Psychiatry*. 167:686-93.
106. Ghadimi D, de Vrese M, Heller KJ, Schrezenmeir J (2010) Lactic acid bacteria enhance autophagic ability of mononuclear phagocytes by increasing Th1 autophagy-promoting cytokine (IFN-gamma) and nitric oxide (NO) levels and reducing Th2 autophagy-restraining cytokines (IL-4 and IL-13) in response to Mycobacterium tuberculosis antigen. *Int Immunopharmacol*. 10:694-706.
107. Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkötter J, Piomelli D (2004) Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*. 29:2108-14.
108. Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 1071:10-23.

109. Gong P, Stewart D, Hu B, Li N, Cook J, Nel A, Alam J (2002) Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 4:249-57.
110. Gonzalez-Pinto A, Martinez-Cengotitabengoa M, Arango C, Baeza I, Otero-Cuesta S, Graell-Berna M, Soutullo C, Leza JC, Micó JA (2012) Antioxidant defense system and family environment in adolescents with family history of psychosis. *BMC Psychiatry*. 12:200.
111. González-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 22:219-40.
112. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 32:593-604.
113. Gorzalka BB, Hill MN (2011) Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35:1575-85.
114. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 126:131-8.
115. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, CDBE2010Study Group. et al. (2011) Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*. 21:718-779.
116. Haller CS, Padmanabhan JL, Lizano P, Torous J, Keshavan M (2014) Recent advances in understanding schizophrenia. *F1000Prime Rep*. 6:57.
117. Han KH, Lim S, Ryu J, Lee CW, Kim Y, Kang JH, Kang SS, Ahn YK, Park CS, Kim JJ (2009) CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovasc Res*. 84:378-86.
118. Haskew-Layton RE, Payappilly JB, Xu H, Bennett SA, Ratan RR (2013) 15-Deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) protects neurons from oxidative death via an Nrf2 astrocyte-specific mechanism independent of PPARγ. *J Neurochem*. 124:536-47.
119. Hayes LN, Severance EG, Leek JT, Gressitt KL, Rohleder C, Coughlin JM, Leweke FM, Yolken RH, Sawa A (2014) Inflammatory molecular signature associated with infectious agents in psychosis. *Schizophr Bull*. 40:963-72.
120. Henry RJ, Kerr DM, Finn DP, Roche M (2015) For whom the endocannabinoid tolls: Modulation of innate immune function and implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. pii: S0278-5846(15)00055-X.
121. Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu QS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2011) Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci*. 31:10506-15.
122. Himmerich H, Schönherr J, Fulda S, Sheldrick AJ, Bauer K, Sack U (2011) Impact of antipsychotics on cytokine production in-vitro. *J Psychiatr Res*. 45:1358-65.
123. Hoffman SW, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Ellis EF (2000) Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *J Neurotrauma*. 17:415-20.
124. Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. (2005) Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry*. 162:2233-45.

125. Hong S, Zheng G, Wu X, Snider NT, Owyang C, Wiley JW (2011) Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology*. 140:627-637.
126. Hosoya T, Maruyama A, Kang MI, Kawatani Y, Shibata T, Uchida K, Warabi E, Noguchi N, Itoh K, Yamamoto M (2005) Differential responses of the Nrf2–Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280:27244–50.
127. Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:619-31.
128. Hu W, Zhang M, Czéh B, Zhang W, Flügge G (2011) Chronic restraint stress impairs endocannabinoid mediated suppression of GABAergic signaling in the hippocampus of adult male rats. *Brain Res Bull.* 85:374-9.
129. Huber CG, Naber D, Lambert M (2008) Incomplete remission and treatment resistance in first-episode psychosis: definition, prevalence and predictors. *Expert Opin Pharmacother.* 9:2027-38.
130. Hungund BL, Vinod KY, Kassir SA, Basavarajappa BS, Yalamanchili R, Cooper TB, Mann JJ, Arango V (2004) Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol Psychiatry.* 9:184-90.
131. Huttenlocher PR (1984) Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am J Ment Defic.* 88:488-96.
132. Ibáñez K, Boullosa C, Tabarés-Seisdedos R, Baudot A, Valencia A (2014) Molecular evidence for the inverse comorbidity between central nervous system disorders and cancers detected by transcriptomic meta-analyses. *PLoS Genet.* 10:e1004173.
133. Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, Yamamoto M (2004) Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol*, 24:36-45.
134. Insel T (2010) Rethinking schizophrenia. *Nature.* 468:187-93.
135. Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* 14:36-49.
136. Jhamnani K, Shivakumar V, Kalmady S, Rao NP, Venkatasubramanian G (2013) Successful use of add-on minocycline for treatment of persistent negative symptoms in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 25:E06-7.
137. Jones MP, Nicholl D, Trakas K (2010) Efficacy and tolerability of paliperidone ER and other oral atypical antipsychotics in schizophrenia. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 48:383-99.
138. Jou I, Lee JH, Park SY, Yoon HJ, Joe EH, Park EJ (2006) Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol.* 168:1619-30.
139. Jung H, Kim T, Chae HZ, Kim KT, Ha H (2001) Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J Biol Chem.* 276:15504-10.
140. Kahn RS, Fleischhacker WW, Boter H, EUFEST study group, et al (2008) Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. *Lancet.* 371:1085-97.
141. Kahn RS, Sommer IE1 (2015) The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 20:84-97.
142. Kaiya H, Uematsu M, Ofuji M, Nishida A, Takeuchi K, Nozaki M, Idaka E (1989) Elevated plasma prostaglandin E2 levels in schizophrenia. *J Neural Transm.* 77:39-46.

143. Kang SH, Kim KH, Kang GY, Lee KH, Kim KK, Soh M, Ahn KJ, Kim SH, Lee JI (2011) Cross-sectional prevalence of metabolic syndrome in Korean patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 128:179-81.
144. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R (2008) Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci.* 13:1813-26.
145. Kapur S, Remington G (2001) Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. *Annu Rev Med.* 52:503-17.
146. Kato T, Monji A, Hashioka S, Kanba S (2007) Risperidone significantly inhibits interferon-gamma-induced microglial activation in vitro. *Schizophr Res.* 92:108-15.
147. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11:373-84.
148. Kawasaki T, Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 5:461.
149. Keshavan MS, Anderson S, Pettegrew JW (1994) Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited. *J Psychiatr Res.* 28:239-65.
150. Kim JJ, Lee SJ, Toh KY, Lee CU, Lee C, Paik IH (2001) Identification of antibodies to heat shock proteins 90 kDa and 70 kDa in patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 52:127-35.
151. Kim JJ, Mandelli L, Lim S, Lim HK, Kwon OJ, Pae CU, Serretti A, Nimgaonkar VL, Paik IH, Jun TY. (2008) Association analysis of heat shock protein 70 gene polymorphisms in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 258:239-44.
152. Kirkpatrick B, Miller BJ (2013) Inflammation and schizophrenia. *Schizophr Bull.* 39:1174-9.
153. Kiyofuji K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Mishima S, Katsuki H (2015) A natural compound macelignan protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via microglial arginase-1 expression. *Eur J Pharmacol.* 760:129-35.
154. Klein TW, Newton CA, Nakachi N, Friedman H (2000)  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *J Immunol.* 164:6461-6.
155. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsui M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 24:7130-9.
156. Koutsouleris N, Meisenzahl EM, Borgwardt S, Riecher-Rössler A, Frodl T, Kambeitz J, Köhler Y, Falkai P, Möller HJ, Reiser M, Davatzikos C (2015) Individualized differential diagnosis of schizophrenia and mood disorders using neuroanatomical biomarkers. *Brain.* 138:2059-73.
157. Krishnamurthy S, Garabadu D, Reddy NR, Joy KP (2011) Risperidone in ultra low dose protects against stress in the rodent cold restraint model by modulating stress pathways. *Neurochem Res.* 36:1750-8.
158. Kucerova J, Tabiova K, Drago F, Micale V (2014) Therapeutic potential of cannabinoids in schizophrenia. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 9:13-25.
159. Kulak A, Steullet P, Cabungcal JH, Werge T, Ingason A, Cuenod M, Do KQ (2013) Redox dysregulation in the pathophysiology of schizophrenia and bipolar disorder: insights from animal models. *Antioxid Redox Signal.* 18:1428-43.

160. Kumar U, Mohanty B2 (2015) Atypical antipsychotic paliperidone prevents behavioral deficits in mice prenatally challenged with bacterial endotoxin lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol.* 747:181-9.
161. Laan W, Grobbee DE, Selten JP, Heijnen CJ, Kahn RS, Burger H (2010) Adjuvant aspirin therapy reduces symptoms of schizophrenia spectrum disorders: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 71:520-7.
162. Lally J, MacCabe JH (2015) Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br Med Bull.* 114:169-79.
163. Lastres-Becker I, Innamorato NG, Jaworski T, Rábano A, Kügler S, Van Leuven F, Cuadrado A (2014) Fractalkine activates NRF2/NFE2L2 and heme oxygenase 1 to restrain tauopathy-induced microgliosis. *Brain.* 137:78-91.
164. Lee CH, Park OK, Yoo KY, Byun K, Lee B, Choi JH, Hwang IK, Kim YM, Won MH (2011) The role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , and effects of its agonist, rosiglitazone, on transient cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci.* 300:120-9.
165. Lee E, Yin Z, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Jiang H, Aschner M, (2012) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  modulates manganese-induced activation of the NF- $\kappa$ B, Nrf2, and PI3K pathways in astrocytes. *Free Radic Biol Med.* 52:1067-74.
166. Lee TS, Chau LY (2002) Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 8:240-6
167. Leonard BE, Schwarz M, Myint AM (2012) The metabolic syndrome in schizophrenia: is inflammation a contributing cause? *J Psychopharmacol.* 26:33-41.
168. Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D (1999) Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport.* 10:1665-69.
169. Lewis DA, Gonzalez-Burgos G (2006) Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med.* 12:1016-22.
170. Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW (1998) The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 286:1397-403.
171. Leza JC, García-Bueno B, Bioque M, Arango C, Parellada M, Do K, O'Donnell P, Bernardo M (2015) Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neurosci Biobehav Rev.* pii: S0149-7634(15)00140-2.
172. Lian J, De Santis M, He M, Deng C (2015) Risperidone-induced weight gain and reduced locomotor activity in juvenile female rats: The role of histaminergic and NPY pathways. *Pharmacol Res.* 95-96:20-6.
173. Limosin F, Rouillon F, Payan C, Cohen JM, Strub N (2003) Prenatal exposure to influenza as a risk factor for adult schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand.* 107:331-5.
174. Lindauer RJ, Olf M, van Meijel EP, Carlier IV, Gersons BP (2006) Cortisol, learning, memory, and attention in relation to smaller hippocampal volume in police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* 59:171-7.
175. Literáti-Nagy Z, Tory K, Literáti-Nagy B, Kolonics A, Török Z, Gombos I, Balogh G, Vigh L Jr, Horváth I, Mandl J, Sümegi B, Hooper PL, Vigh L (2012) The HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics. *Cell Stress Chaperones.* 17:517-21.



176. Liu GH, Qu J, Shen X (2008) NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta*. 1783:713-27.
177. Liu QR, Pan CH, Hishimoto A, Li CY, Xi ZX, Llorente-Berzal A, Viveros MP, Ishiguro H, Arinami T, Onaivi ES, Uhl GR (2009) Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav*. 8:519-30.
178. Lourbopoulos A, Grigoriadis N, Lagoudaki R, Touloumi O, Polyzoidou E, Mavromatis I, Tascos N, Breuer A, Ovadia H, Karussis D, Shohami E, Mechoulam R, Simeonidou C (2011) Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*. 1390:126-41.
179. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015 Jun 1. doi: 10.1038/nature14432.
180. Lu Y, Peng F, Dong M, Yang H (2014) Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects primary cultured neurons against LPS-induced impairments in rat caudate nucleus. *J Mol Neurosci*. 54:49-58.
181. Lu Y, Wollak KN, Cross VA, Westrick E, Wheeler LW, Stinnette TW, Vaughn JF, Hahn SJ, Xu LC, Vlahov IR, Leamon CP (2014) Folate receptor-targeted aminopterin therapy is highly effective and specific in experimental models of autoimmune uveitis and autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol*. 150:64-77.
182. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*. 147:S232-S240.
183. Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A (2001) Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys*. 393:321-8.
184. Mackie K. (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb.Exp.Pharmacol*. 299-325.
185. Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2001) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem*. 76:532-38.
186. Madrigal JL, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2002a) The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*. 26:155-63.
187. Madrigal JL, Caso JR, De CJ, Cardenas A, Leza JC, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA (2003a) Effect of subacute and chronic immobilisation stress on the outcome of permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Brain Res*. 979:137-45.
188. Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC (2003b) Relationship between cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in rat cortex after stress. *Eur J Neurosci*. 18:1701-5.
189. Maes M, Kubera M, Leunis JC (2008) The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative

- enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett.* 29:117-24.
190. Magariños A. M., Verdugo J. M. and McEwen B. S. (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:14002-8.
  191. Mahajan K, Mahajan NP (2012) PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 227:3178-84.
  192. Maier SF, Watkins LR (1998) Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev.* 105:83-107.
  193. Mangano MN, Litteljohn D, So R, Nelson E, Peters S, Bethune C, Bobyn J, Hayley S (2012) Interferon-gamma plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways. *Neurobiol Aging.* 33:1411-26.
  194. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-86.
  195. Marco EM, Echeverry-Alzate V, Lopez-Moreno JA, Gine E, Penasco S, Viveros MP. (2014) Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. *Behav.Pharmacol.* 25:547-56.
  196. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13:453-61.
  197. Martínez-Cengotitabengoa M, Mac-Dowell KS, Leza JC, Micó JA, Fernandez M, Echevarría E, Sanjuan J, Elorza J, González-Pinto A (2012) Cognitive impairment is related to oxidative stress and chemokine levels in first psychotic episodes. *Schizophr Res.* 137:66-72.
  198. Martínez-Cengotitabengoa M, Micó JA, Arango C, Castro-Fornieles J, Graell M, Payá B, Leza JC, Zorrilla I, Parellada M, López MP, Baeza I, Moreno C, Rapado-Castro M, González-Pinto A (2014) Basal low antioxidant capacity correlates with cognitive deficits in early onset psychosis. A 2-year follow-up study. *Schizophr Res.* 156:23-9.
  199. Martínez-Gras I, Pérez-Nievas BG, García-Bueno B, Madrigal JL, Andrés-Esteban E, Rodríguez-Jiménez R, Hoenicka J, Palomo T, Rubio G, Leza JC (2011) The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 and its nuclear receptor PPARgamma are decreased in schizophrenia. *Schizophr Res.* 128:15-22.
  200. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner D (2009) Horror Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease. *Annu Rev Immunol.* 27: 621-68
  201. Mathers C, Loncar D (2006) Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3:e442.
  202. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346:561-4.
  203. Matsumoto M, Seya T (2008) TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev.* 60:805-12.
  204. McEwen BS, Sapolsky RM (1995) Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5:205-16.
  205. McEwen BS (2000) Stress, definition and concepts of.. In: Encyclopedia of stress pp 508-509. San Diego (CA, USA): Academic Press.

206. McGorry PD, Cocks J, Power P, Burnett P, Harrigan S, Lambert T (2011) Very low-dose risperidone in first-episode psychosis: a safe and effective way to initiate treatment. *Schizophr Res Treatment*. 2011:631690.
207. McKernan DP, Dennison U, Gaszner G, Cryan JF, Dinan TG (2011) Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype. *Transl Psychiatry*. 1:e36.
208. McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. (2005) *Annu.Rev.Biochem*. 74:411-32.
209. McLaughlin RJ, Hill MN, Dang SS, Wainwright SR, Galea LA, Hillard CJ, Gorzalka BB (2013) Upregulation of CB<sub>1</sub> receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. *Behav Brain Res*. 237:333-7.
210. McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Cole-Strauss A, Lipton JW (2011) Atypical antipsychotic medications increase postprandial triglyceride and glucose levels in male rats: relationship with stearyl-CoA desaturase activity. *Schizophr Res*. 129:66-73.
211. McPartland JM, Guy GW, Di Marzo V (2014) Care and feeding of the endocannabinoid system: a systematic review of potential clinical interventions that upregulate the endocannabinoid system. *PLoS One*. 9:e89566.
212. Mechoulam R, Shohami E. (2007) Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol.Neurobiol*. 36:68-74.
213. Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D (1988) Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry*. 45:189-92.
214. Melis M, Pistis M (2012) Hub and switches: endocannabinoid signalling in midbrain dopamine neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367:3276-85.
215. Melis M, Carta G, Pistis M, Banni S (2013) Physiological role of peroxisome proliferator-activated receptors type  $\alpha$  on dopamine systems. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 12:70-7.
216. Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee B (2005) Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*. 29:913-47.
217. Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J (2008) Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun*. 22:469-86.
218. Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 65:732-41.
219. Mitra S, Haque Nizamie S, Goyal N, Tikka SK (2015) Event related desynchronisation of mu-wave over right sensorimotor cortex at baseline may predict subsequent response to antipsychotics in Schizophrenia. *Asian J Psychiatry*. 14:19-21.
220. Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Kosugi A (2002) Essential role of MD-2 in B-cell responses to lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 distribution. *J Endotoxin Res*. 8:449-52.
221. Moghaddam B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem*. 60:1650-7.
222. Monji A, Kato T, Kanba S (2009) Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 63:257-65.

223. Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Yamauchi Y, Yamada S, Kanba S (2013) Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 42:115-21.
224. Montgomery SA, Asberg M (1979) A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry*. 134:382-9.
225. Montgomery SL, Bowers WJ (2012) Tumor necrosis factor- alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 7:42-59.
226. Morgan C, Fisher H (2007) Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma--a critical review. *Schizophr Bull*. 33:3-10.
227. Müller N, Schwarz MJ (2008) A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelins dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 258:97-106.
228. Müller N, Krause D, Dehning S, Musil R, Schennach-Wolff R, Obermeier M, Möller HJ, Klauss V, Schwarz MJ, Riedel M (2010) Celecoxib treatment in an early stage of schizophrenia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of celecoxib augmentation of amisulpride treatment. *Schizophr Res*. 121:118-24.
229. Müller N, Myint AM, Schwarz MJ (2011) Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Curr Pharm Des*. 17:130-6.
230. Müller N, Wagner JK, Krause D, Weidinger E, Wildenauer A, Obermeier M, Dehning S, Gruber R, Schwarz MJ (2012) Impaired monocyte activation in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 198:341-6.
231. Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999) Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 163:3771-7.
232. Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci*. 30:13690-8.
233. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61-5.
234. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380:2197-223.
235. Na KS, Kim WH, Jung HY, Ryu SG, Min KJ, Park KC, Kim YS, Yoon JS, Ahn YM, Kim CE (2012) Relationship between inflammation and metabolic syndrome following treatment with paliperidone for schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 39:295-300.
236. Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, Hasko J, Krizbai IA (2010) Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int*. 57:556-64.
237. Naiker DV, Catts SV, Catts VS, Bedi KS, et al. (2006) Dose determination of haloperidol, risperidone and olanzapine using an in vivo dopamine D2-receptor occupancy method in the rat. *Eur J Pharmacol*. 540:87–90.

238. Nair SM, Werkman TR, Craig J, Finnell R, Joels M, Eberwine JH (1998) Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* 18:2685-96.
239. Nair S, Doh ST, Chan JY, Kong AN, Cai L (2008) Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. *Br J Cancer.* 99:2070-82.
240. Naito Y, Takagi T, Higashimura Y (2014) Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 564:83-8.
241. Nakagawa Y, Chiba K (2014) Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel).* 7:1028-48.
242. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H (2012) Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 29:1614-25.
243. Nasrallah HA, Hopkins T, Pixley SK (2010) Differential effects of antipsychotic and antidepressant drugs on neurogenic regions in rats. *Brain Res.* 1354:23-9.
244. Newton CA, Chou PJ, Perkins I, Klein TW. (2009) CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors mediate different aspects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced T helper cell shift following immune activation by *Legionella pneumophila* infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4:92-102.
245. Nitta M, Kishimoto T, Müller N, Weiser M, Davidson M, Kane JM, Correll CU (2013) Adjunctive use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for schizophrenia: a meta-analytic investigation of randomized controlled trials. *Schizophr Bull.* 39:1230-41.
246. Notaras M, Hill R, van den Buuse M (2015) A role for the BDNF gene Val66Met polymorphism in schizophrenia? A comprehensive review. *Neurosci Biobehav Rev.* 51:15-30.
247. Noto C, Ota VK, Gouvea ES, Rizzo LB, Spindola LM, Honda PH, Cordeiro Q, Belangero SI, Bressan RA, Gadelha A, Maes M, Brietzke E (2014) Effects of risperidone on cytokine profile in drug-naïve first-episode psychosis. *Int J Neuropsychopharmacol.* 18(4).
248. Oh JY, Giles N, Landar A, Darley-Usmar V (2008) Accumulation of 15-deoxy- $\Delta^{(12,14)}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. *Biochem. J.* 411:297–306.
249. Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 34:269-81.
250. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jönsson B; CDBE2010 study group; European Brain Council (2012) The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol.* 19:155-62.
251. Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernández AP, Rodrigo J, Boscá L, Leza JC (2000) Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem.* 74:785-91.
252. Olmos G, Lladó J (2014) Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014:861231.
253. Olsen CK, Brennum LT, Kreilgaard M (2008) Using pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling as a tool for prediction of therapeutic effective plasma levels of antipsychotics. *Eur J Pharmacol.* 584:318-27.

254. Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 173:3916-24.
255. Ortega-Alvaro A, Aracil-Fernandez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Manzanares J (2011) Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology.* 36:1489-504.
256. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y (2003) Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol.* 170:3977-85.
257. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6:422-8.
258. Padmavati R, McCreadie RG, Tirupati S (2010) Low prevalence of obesity and metabolic syndrome in never-treated chronic schizophrenia. *Schizophr Res.* 121:199-202.
259. Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C (2010) Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett.* 479:317-20.
260. Pae CU, Drago A, Kim JJ, Mandelli L, De Ronchi D, Serretti A (2009) The impact of heat shock protein 70 gene variations on clinical presentation and outcome in schizophrenic inpatients. *Neuropsychobiology.* 59:135-41.
261. Patel S, Rademacher DJ, Hillard CJ (2003) Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 306:880-8.
262. Patel S, Kingsley PJ, Mackie K, Marnett LJ, Winder DG (2009) Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology.* 34:2699-709.
263. Paus T, Keshavan M, Giedd JN (2008) Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci.* 9:947-57.
264. Pelayo-Terán JM, Suárez-Pinilla P, Chadi N, Crespo-Facorro B (2012) Gene-environment interactions underlying the effect of cannabis in first episode psychosis. *Curr Pharm Des.* 18:5024-35.
265. Penner JD, Brown AS (2007) Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert Rev Neurother.* 7:797-805.
266. Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsä E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppä T, Härkänen T, Koskinen S, Lönnqvist J (2007) Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry.* 64:19-28.
267. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:49-62.
268. Piccinini AM, Midwood KS (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010:672395.
269. Pickar D, Litman RE, Konicki PE, Wolkowitz OM, Breier A (1990) Neurochemical and neural mechanisms of positive and negative symptoms in schizophrenia. *Mod Probl Pharmacopsychiatry.* 24:124-51

270. Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4:873-84.
271. Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I (2011) Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 37:1257-69.
272. Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I (2012) Tracing the development of psychosis and its prevention: what can be learned from animal models. *Neuropharmacology.* 62:1273-89.
273. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* 1813:1619-33.
274. Pocklington AJ, O'Donovan M, Owen MJ (2014) The synapse in schizophrenia. *Eur J Neurosci.* 39:1059-67.
275. Poland RE, Cloak C, Lutchmansingh PJ, McCracken JT, Chang L, Ernst T (1999) Brain N-acetyl aspartate concentrations measured by H MRS are reduced in adult male rats subjected to perinatal stress: preliminary observations and hypothetical implications for neurodevelopmental disorders. *J Psychiatr Res.* 33:41-51.
276. Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, Lizasoain I, Menchén P, Gómez-Lus ML, Lorenzo P, Cos E, Leza JC, Menchén L (2007) The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology.* 132:1791-803.
277. Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Ratnam M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL (2009) Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res.* 69:9395-403.
278. Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006) Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26:12967-76.
279. Ramaekers VT, Thöny B, Sequeira JM, Anseau M, Philippe P, Boemer F, Bours V, Quadros EV (2014) Folinic acid treatment for schizophrenia associated with folate receptor autoantibodies. *Mol Genet Metab.* 113:307-14.
280. Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 122:1164-71.
281. Rappart F, Müller N (2004) Celecoxib Add-on Therapy does not have beneficial antipsychotic Effects over Risperidone alone in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 29:222.
282. Regenthal R, Kunstler U, Hesse S, Sabri O, Preiss R (2005) D2 dopamine receptor occupancy, risperidone plasma level and extrapyramidal motor symptoms in previously drug-free schizophrenic patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 43:370-8.
283. Reilly MP, Rader DJ (2003) The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 108:1546-51.
284. Reisenberg M, Singh PK, Williams G, Doherty P. (2012) The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:3264-75.
285. Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak DD (2015) The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther.* 149:213-26.

286. Richtand NM, Ahlbrand R, Horn P, Stanford K, Bronson SL, McNamara RK (2011) Effects of risperidone and paliperidone pre-treatment on locomotor response following prenatal immune activation. *J Psychiatr Res.* 45:1194-201.
287. Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F (2006) Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol.* 126:177-87.
288. Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE (2006) Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol. Pharmacol.* 70:101-11.
289. Roenker NL, Gudelsky G, Ahlbrand R, Bronson SL, Kern JR, Waterman H, Richtand NM (2011) Effect of paliperidone and risperidone on extracellular glutamate in the prefrontal cortex of rats exposed to prenatal immune activation or MK-801. *Neurosci Lett.* 500:167-71.
290. Rogóż Z (2013) Combined treatment with atypical antipsychotics and antidepressants in treatment-resistant depression: preclinical and clinical efficacy. *Pharmacol Rep.* 65:1535-44.
291. Roh K, Roh S, Yang BH, Lee JS, Chai YG, Choi MR, Park YC, Kim DJ, Kim D, Choi J, Kim SH (2008) Effects of haloperidol and risperidone on the expression of heat shock protein 70 in MK- 801-treated rat C6 glioma cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:1793-7.
292. Roman A, Kuśmierczyk J, Klimek E, Rogóż Z, Nalepa I (2012) Effects of co-administration of fluoxetine and risperidone on properties of peritoneal and pleural macrophages in rats subjected to the forced swimming test. *Pharmacol Rep.* 64:1368-80.
293. Ross RA (2003) Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* 140:790-801.
294. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. *Nature.* 403:103-108.
295. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 152:1092-101.
296. Salter M, Duffy C, Garthwaite J, Strijbos PJ (1996) Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *J Neurochem.* 66:1683-90.
297. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 1813:878-88.
298. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from a small number of cells. *NucleicAcids Res.* 17:6419.
299. Scott P (1991) IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 147:3149-55.
300. Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 138:32.
301. Selye H (1976) Further thoughts on "stress without distress". *Med Times* 104:124-44.
302. Seong SY, Matzinger P (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 4:469-78.



303. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21:325-32.
304. Serretti A, Fabbri C (2013) Shared genetics among major psychiatric disorders. *Lancet.* 381:1339-41.
305. Severance EG, Gressitt KL, Stallings CR, Origoni AE, Khushalani S, Leweke FM, Dickerson FB, Yolken RH (2013) Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia. *Schizophr Res.* 148:130-7.
306. Shaffer D, Gould MS, Brasic J, Ambrosini P, Fisher P, Bird H, Aluwahlia S (1983) A children's global assessment scale (CGAS). *Arch Gen Psychiatry.* 40:1228-31.
307. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H (2010) Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 87:521-36.
308. Shepherd AM, Laurens KR, Matheson SL, Carr VJ, Green MJ (2012) Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:1342-56.
309. Shirai Y, Fujita Y, Hashimoto K (2012) Effects of the antioxidant sulforaphane on hyperlocomotion and prepulse inhibition deficits in mice after phencyclidine administration. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 10:94-8.
310. Shirai Y, Fujita Y, Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Ishima T, Suganuma H, Ushida Y, Takeda M, Hashimoto K (2015) Dietary Intake of Sulforaphane-Rich Broccoli Sprout Extracts during Juvenile and Adolescence Can Prevent Phencyclidine-Induced Cognitive Deficits at Adulthood. *PLoS One.* 10:e0127244.
311. Singh AK, Jiang Y (2004) How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?. *Toxicology.* 201:197-207.
312. Skaper SD, Di Marzo V (2012) Endocannabinoids in nervous system health and disease: the big picture in a nutshell. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:3193-200.
313. Sommer IE, de Witte L, Begemann M, Kahn RS (2012) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in schizophrenia: ready for practice or a good start? A meta-analysis. *J Clin Psychiatry.* 73:414-419.
314. Sommer IE, van Westrhenen R, Begemann MJ, de Witte LD, Leucht S, Kahn RS (2013) Efficacy of anti-inflammatory agents to improve symptoms in patients with schizophrenia: an update. *Schizophr Bull.* 40:181-191.
315. Song XQ, Lv LX, Li WQ, Hao YH, Zhao JP (2009) The interaction of nuclear factor-kappa B and cytokines is associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 65:481-8.
316. Sorrells SF, Sapolsky RM (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 21:259-72.
317. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron.* 6:33-9.
318. Stahl SM, Buckley PF (2007) Negative symptoms of schizophrenia: a problem that will not go away. *Acta Psychiatr Scand.* 115:4-11.
319. Stahl SM (2010) Psychiatric stress testing: novel strategy for translational psychopharmacology. *Neuropsychopharmacology.* 35:1413-4.
320. Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA (2006) Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry.* 188:510-8.

321. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 176:287-92.
322. Steiner J, Bielau H, Brisch R, Danos P, Ullrich O, Mawrin C, Bernstein HG, Bogerts B (2008) Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res.* 42:151-7.
323. Stojković T, Radonjić NV, Velimirović M, Jevtić G, Popović V, Doknić M, Petronijević ND (2012) Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 39:192-9.
324. Straub RE, Weinberger DR (2006) Schizophrenia genes-famine to feast. *Biol Psychiatry.* 60:81-3.
325. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4844-49.
326. Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 40:133-9.
327. Sugino H, Futamura T, Mitsumoto Y, Maeda K, Marunaka Y (2009) Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33:303-7.
328. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K (2002) Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66:173-92.
329. Suh HS, Zhao ML, Riveccio M, Choi S, Connolly E, Zhao Y, Takikawa O, Brosnan CF, Lee SC (2007) Astrocyte indoleamine 2,3-dioxygenase is induced by the TLR3 ligand poly(I:C): mechanism of induction and role in antiviral response. *J Virol.* 81:9838-50.
330. Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ (2007) Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol.* 152:734-43.
331. Sun Z, Wu T, Zhao F, Lau A, Birch CM, Zhang DD (2011) KPNA6 (Importin  $\alpha$ 7)-Mediated Nuclear Import of Keap1 Represses the Nrf2-Dependent Antioxidant Response. *Mol Cell Biol.* 31:1800-11.
332. Tafet GE, Bernardini R (2003) Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27:893-903.
333. Takadera T, Yumoto H, Tozuka Y, Ohyashiki T (2002) Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett.* 317:61-4.
334. Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21:335-76.
335. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res.* 110:1-23.
336. Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol.* 213:114-21.
337. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 23:901-44.

338. Tchantchou F, Tucker LB, Fu AH, Bluett RJ, McCabe JT, Patel S, Zhang Y (2014) The fatty acid amide hydrolase inhibitor PF-3845 promotes neuronal survival, attenuates inflammation and improves functional recovery in mice with traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. 85:427-39.
339. Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M (2007) Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett*. 581:2899-904.
340. Thomas JO, Travers AA (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 26:167-74.
341. Tsuboi K, Ikematsu N, Uyama T, Deutsch DG, Tokumura A, Ueda N (2013) Biosynthetic pathways of bioactive N-acylethanolamines in brain. *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets*. 12:7-16.
342. Tsuneyoshi Y, Tanaka M, Nagai T, Sunahara N, Matsuda T, Sonoda T, Ijiri K, Komiya S, Matsuyama T (2012) Functional folate receptor beta-expressing macrophages in osteoarthritis synovium and their M1/M2 expression profiles. *Scand J Rheumatol*. 41:132-40.
343. Ulloa RE, Ortiz S, Higuera F, Nogales I, Fresán A, Apiquian R, Cortés J, Arechavaleta B, Foullieux C, Martínez P, Hernández L, Domínguez E, de la Peña F (2006) Interrater reliability of the Spanish version of Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children--Present and Lifetime version (K-SADS-PL). *Actas Esp Psiquiatr*. 34:36-40.
344. Upthegrove R, Manzanares-Teson N, Barnes NM (2014) Cytokine function in medication-naïve first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res*. 155:101-108.
345. Valverde O, Torrens M (2012) CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. *Neuroscience*. 204:193-206.
346. van Dongen J, Boomsma DI (2013) The evolutionary paradox and the missing heritability of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 162B:122-36.
347. Varga G, Ehrchen J, Brockhausen A, Weinlage T, Nippe N, Belz M, Tsianakas A, Ross M, Bettenworth D, Spieker T, Wolf M, Lippe R, Tenbrock K, Leenen PJ, Roth J, Sunderkötter C (2014) Immune suppression via glucocorticoid-stimulated monocytes: a novel mechanism to cope with inflammation. *J Immunol*. 193:1090-9.
348. Venkatasubramanian G, Debnath M (2013) The TRIPS (Toll-like receptors in immuno-inflammatory pathogenesis) Hypothesis: a novel postulate to understand schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 44:301-11.
349. Volk DW, Lewis DA (2010) Prefrontal cortical circuits in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 4:485-508.
350. Vriend J, Reiter RJ (2015) The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol Cell Endocrinol*. 401:213-20.
351. Vyas A, Mitra R, Shakaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 22:6810-18.
352. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U,

- Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 285:248-51.
353. Wang HR, Woo YS, Bahk WM (2013) Atypical antipsychotics in the treatment of posttraumatic stress disorder. *Clin Neuropharmacol*. 36:216-22.
354. Watson CG, Kucala T, Tilleskjor C, Jacobs L (1984) Schizophrenic birth seasonality in relation to the incidence of infectious diseases and temperature extremes. *Arch Gen Psychiatry*. 41:85-90.
355. Wei J, Hemmings GP (2005) Gene, gut and schizophrenia: the meeting point for the gene-environment interaction in developing schizophrenia. *Med Hypotheses*. 64:547-52.
356. Weis N, Weigert A, von Knethen A, Brüne B (2009) Heme Oxygenase-1 Contributes to an Alternative Macrophage Activation Profile Induced by Apoptotic Cell Supernatants. *Mol Biol Cell*. 20:1280-8.
357. Xiang L, Del Ben KS, Rehm KE, Marshall GD (2012) Effects of acute stress-induced immunomodulation on Th1/Th2 cytokine and catecholamine receptor expression in human peripheral blood cells. *Neuropsychobiology*. 65:12-9.
358. Xing G, Carlton J, Zhang L, Jiang X, Fullerton C, Li H, Ursano R (2011) Cannabinoid receptor expression and phosphorylation are differentially regulated between male and female cerebellum and brain stem after repeated stress: implication for PTSD and drug abuse. *Neurosci Lett*. 502:5-9.
359. Yang QW, Xiang J, Zhou Y, Zhong Q, Li JC (2010) Targeting HMGB1/ TLR4 signaling as a novel approach to treatment of cerebral ischemia. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2:1081-91.
360. Yi JH, Park SW, Brooks N, Lang BT, Vemuganti R (2008) PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury via anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. *Brain Res*. 1244:164-72.
361. Yokota O, Terada S, Ishihara T, Nakashima H, Kugo A, Ujike H, Tsuchiya K, Ikeda K, Saito Y, Murayama S, Ishizu H, Kuroda S (2004) Neuronal expression of cyclooxygenase-2, a pro-inflammatory protein, in the hippocampus of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28:715-21.
362. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA (1978) A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry*. 133:429-35.
363. Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Abel L, Casanova JL (2013) TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol*. 25:19-33.
364. Zhang XR, Zhang ZJ, Jenkins TA, Cheng WR, Reynolds GP (2010) The effect of chronic antipsychotic drug administration on nitric oxide synthase activity and gene expression in rat penile tissues. *Eur Neuropsychopharmacol*. 20:211-7.
365. Zhu J, Smith K, Hsieh PN, Mburu YK, Chattopadhyay S, Sen GC, Sarkar SN (2010) High-throughput screening for TLR3-IFN regulatory factor 3 signaling pathway modulators identifies several antipsychotic drugs as TLR inhibitors. *J Immunol*. 184:5768-76.
366. Zoppi S, Perez Nieves BG, Madrigal JL, Manzanares J, Leza JC, Garcia-Bueno B (2011) Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*. 36:805-18.



## IX. Anexo

## 1. ANEXO

### 1.1 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

- a) **MacDowell KS**, García-Bueno B, Madrigal JL, Parellada M, Arango C, Micó JA, Leza JC (2013) Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 16(1):121-35.  
**FI:** 5.26; D1 Pharmacology & Pharmacy, Q1 Clinical Neurology, Q1 Psychiatry, Q2 Neurosciences.
  
- b) **MacDowell KS**, Caso JR, Martín-Hernández D, Madrigal JL, Leza JC, García-Bueno B (2014) Paliperidone prevents brain toll-like receptor 4 pathway activation and neuroinflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *Int J Neuropsychopharmacol*. 18(3).  
**FI:** 5.26; D1 Pharmacology & Pharmacy, Q1 Clinical Neurology, Q1 Psychiatry, Q2 Neurosciences.
  
- c) García-Bueno B, Bioque M, **Mac-Dowell KS**, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L, Rodríguez-Jiménez R, Sáiz PA, Castro C, Lafuente A, Santabárbara J, González-Pinto A, Parellada M, Rubio G, García-Portilla MP, Micó JA, Bernardo M, Leza JC (2014) Pro-/anti-inflammatory dysregulation in patients with first episode of psychosis: toward an integrative inflammatory hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 40(2):376-87. \* Primera autoría compartida.  
**FI:** 8.45; D1 Psychiatry.

- d) García-Bueno B, Bioque M, **MacDowell KS**, Santabárbara J, Martínez-Cengotitabengoa M, Moreno C, Sáiz PA, Berrocoso E, Gassó P, Fe Barcones M, González-Pinto A, Parellada M, Bobes J, Micó JA, Bernardo M1, Leza JC; FLAMM-PEPs study, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain (2014) Pro-/antiinflammatory dysregulation in early psychosis: results from a 1-year follow-up study. *Int J Neuropsychopharmacol.* 18(2). \* Primera autoría compartida.
- FI:** 5.26; D1 Pharmacology & Pharmacy, Q1 Clinical Neurology, Q1 Psychiatry, Q2 Neurosciences.

## 1.2 OTROS MANUSCRITOS EN PROCESO DE PUBLICACIÓN RELACIONADOS CON LA TESIS DOCTORAL.

- a) **MacDowell KS**, Sayd A, García-Bueno B, Caso JR, Madrigal JL, Leza JC. Effects of the antipsychotic paliperidone on stress-induced changes in the endocannabinoid system in rat prefrontal cortex. *The World Journal of Biological Psychiatry.* (Submitted).
- b) **MacDowell KS**, García-Bueno B, Caso JR, Martín-Hernández D, Madrigal JL, Leza JC. Antiinflammatory/antioxidant profile of paliperidone on stress-induced neuroinflammation in rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.* (Submitted).





# Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation

Karina S. MacDowell<sup>1,2,3</sup>, Borja García-Bueno<sup>1,2,3</sup>, José L. M. Madrigal<sup>1,2,3</sup>, Mara Parellada<sup>2,4</sup>, Celso Arango<sup>2,4</sup>, Juan A. Micó<sup>2,5</sup> and Juan C. Leza<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (I+12), Madrid, Spain

<sup>4</sup> Department of Child and Adolescent Psychiatry, Hospital General Universitario Gregorio Marañón and Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>5</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Cádiz, Spain

## Abstract

Inflammation, caused by both external and endogenous factors, has been implicated as a main pathophysiological feature of chronic mental illnesses, including schizophrenia. An increase in pro-inflammatory cytokines has been described both in experimental models and in schizophrenia patients. However, not much is known about the effects that antipsychotic drugs have on intra- and intercellular mechanisms controlling inflammation. The aim of the present study was to investigate the possible anti-inflammatory effect of a standard schizophrenia treatment not only at the level of soluble mediators, but also at intra- and intercellular inflammatory pathways. The present study was conducted in a model of mild neuroinflammation using a lipopolysaccharide (LPS) challenge that was not an endotoxaemic dose (0.5 mg/kg i.p.) in young adult rats. Main results: single doses of risperidone (0.3–3.0 mg/kg i.p.) prevented increased inflammatory parameters induced by LPS in brain cortex [expression of inflammatory cytokines, interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , activity of the inducible inflammatory enzymes nitric oxide synthase and cyclooxygenase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and inflammatory nuclear transcription factor  $\kappa$ B] and restored anti-inflammatory pathways decreased by LPS challenge (deoxyprostaglandins and peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ). This is the first study demonstrating that risperidone elicits a preventive effect on the anti-inflammatory arm of the homeostatic mechanism controlling inflammation in a model of mild encephalitis in rats. Our findings suggest a possible protective effect of risperidone on brain cells.

Received 26 July 2011; Reviewed 15 August 2011; Revised 8 November 2011; Accepted 12 November 2011

**Key words:** Antipsychotics, LPS, neuroinflammation, risperidone, schizophrenia.

## Introduction

The pathophysiology of schizophrenia is unknown, although several aetiological theories have been proposed for the disease, including developmental or neurodegenerative processes, neurotransmitter abnormalities, immune dysfunction or inflammatory mechanisms.

Over the past two decades, inflammation, caused by both external and endogenous factors, has been implicated as a main pathophysiological feature of chronic mental illnesses, including schizophrenia (Lucas *et al.* 2006). A large amount of data supports an inflammatory hypothesis in the pathophysiology of schizophrenia: (1) the demonstration of a pro-inflammatory cytokine profile in plasma, serum, cerebrospinal fluid (CSF) or in post-mortem brain tissue (Drexhage *et al.* 2008; Müller & Schwarz, 2008) of schizophrenia patients; (2) elevated plasma levels of the inflammatory mediator prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), the major product of the enzyme cyclooxygenase

---

Address for correspondence: Dr J. C. Leza, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

Tel.: +34 91 394 1478/64 Fax: +34 91 394 1464

Email: jcleza@med.ucm.es

RESEARCH ARTICLE

# Paliperidone Prevents Brain Toll-Like Receptor 4 Pathway Activation and Neuroinflammation in Rat Models of Acute and Chronic Restraint Stress

KS MacDowell, MSc; JR Caso, PhD; D Martín-Hernández, MSc;  
JL Madrigal, PhD; JC Leza, MD, PhD; B García-Bueno, PhD

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University Complutense, Madrid, Spain (Mr MacDowell, Mr Martín-Hernández, Drs Madrigal, Leza, and García-Bueno); Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University Complutense, Madrid, Spain (Dr Caso); Centro de Investigación Biomédica en Salud Mental (CIBERSAM), Spain (Drs MacDowell, Martín-Hernández, Caso, Madrigal, Leza, and García-Bueno); Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre and Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica UCM (Drs MacDowell, Martín-Hernández, Caso, Madrigal, Leza, and García-Bueno)

Correspondence: Borja García-Bueno, PhD, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University Complutense, Avenida Complutense, 28040 Madrid, Spain ([bgbueno@med.ucm.es](mailto:bgbueno@med.ucm.es))

## Abstract

**Background:** Alterations in the innate immune/inflammatory system have been proposed to underlie the pathophysiology of psychotic disease, but the mechanisms implicated remain elusive. The main agents of the innate immunity are the family of toll-like receptors (TLRs), which detect circulating pathogen-associated molecular patterns and endogenous damage-associated molecular patterns (DAMPs). Current antipsychotics are able to modulate pro- and anti-inflammatory pathways, but their actions on TLRs remain unexplored.

**Methods:** This study was conducted to elucidate the effects of paliperidone (1 mg/Kg i.p.) on acute (6 hours) and chronic (6 hours/day during 21 consecutive days) restraint stress-induced TLR-4 pathway activation and neuroinflammation, and the possible mechanism(s) related (bacterial translocation and/or DAMPs activation). The expression of the elements of a TLR-4-dependent proinflammatory pathway was analyzed at the mRNA and protein levels in prefrontal cortex samples.

**Results:** Paliperidone pre-treatment prevented TLR-4 activation and neuroinflammation in the prefrontal cortices of stressed rats. Regarding the possible mechanisms implicated, paliperidone regulated stress-induced increased intestinal inflammation and plasma lipopolysaccharide levels. In addition, paliperidone also prevented the activation of the endogenous activators of TLR-4 HSP70 and HGMB-1.

**Conclusions:** Our results showed a regulatory role of paliperidone on brain TLR-4, which could explain the therapeutic benefits of its use for the treatment of psychotic diseases beyond its effects on dopamine and serotonin neurotransmission. The study of the mechanisms implicated suggests that gut-increased permeability, inflammation, and bacterial translocation of Gram-negative microflora and HSP70 and HGMB1 expression could be potential adjuvant therapeutic targets for the treatment of psychotic and other stress-related psychiatric pathologies.

**Keywords:** antipsychotics, bacterial translocation, damage-associated molecular patterns, stress, toll-like receptor-4

Received: May 27, 2014; Revised: July 25, 2014; Accepted: July 25, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

## Introduction

Psychosocial and/or physical stress exposure is an environmental risk factor for psychiatric disease (Stahl, 2010). One of the putative mechanisms involved is the stress-induced activation of the innate inflammatory/immune response (rev. in Garcia-Bueno et al., 2008).

The innate immunity is a stereotyped, nonspecific response, and is considered a protective mechanism; however, if excessive in intensity (overexpression or overactivity of several mediators) or time (inefficient resolution), it becomes harmful (Lampron et al., 2013). The main agents of the innate immune response are the family of toll-like receptors (TLRs). TLRs are pattern-recognition receptors that detect circulating pathogen-associated molecular patterns present in pathogens but not in mammalian cells. These patterns trigger a complex pro-inflammatory cascade that can impact the central nervous system (CNS), regulating homeostasis and even promoting pathology (rev. in Medzhitov, 2001). TLRs are highly expressed in immune cells (Akira et al., 2006) and, in the last years, TLR presence has been also found in different CNS-intrinsic cell types, such as neurons, astrocytes, resident microglia, or cells in cerebral microvasculature, plexus choroideus, and leptomeninges (Hanke and Kielian, 2011). This ubiquitous distribution suggests other roles for TLRs in non-pathogen associated CNS diseases or injuries, such as the recognition of a number of endogenous molecules released from damaged tissues (damage-associated molecular patterns [DAMPs]; Piccinini and Midwood, 2010) in a great diversity of processes, such as autoimmunity, neurogenesis, and brain plasticity (Fischer and Ehlers, 2008; Hanke and Kielian, 2011).

The most representative member of the TLR family is TLR-4, which predominantly responds to lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria (Takeuchi and Akira, 2001) through its co-receptor, myeloid differentiation protein-2 (MD-2), a requisite for LPS signaling of TLR-4 (Shimazu et al., 1999). To achieve specificity of signaling, TLR-4 recruits some other adapter proteins during intracellular signal transduction, such as the myeloid differentiation factor 88 (MyD88). After various consecutive steps in the transduction pathway (that is, specific kinases), the activation of cytokines and the prototypic inflammatory nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B (Means et al., 2000) culminate in the production of NF- $\kappa$ B dependent pro-inflammatory mediators, such as the enzymes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2; Madrigal et al., 2006).

In the last years, alterations on the innate immune/inflammatory system have been implicated in the pathophysiology of psychotic and other psychiatric diseases (Meyer et al., 2011; Kirkpatrick and Miller, 2013). The precise mechanisms are still obscure, but several theories exist: (a) immune challenges before birth (prenatal or maternal infections, diabetes) and obstetric complications (fetal hypoxia, preeclampsia) may prime an immature fetal immune system that will remain impaired for a lifetime (Brown and Derkits, 2010); (b) immune insults in decisive periods of neurodevelopment and maturation (i.e., in adolescence; Meyer, 2013); or (c) inflammatory lifetime changes produced by diverse environmental factors (psychological stress, latent infections, diet, psychotropic drugs abuse, etc.; Suvisaari and Mantere, 2013). In addition, a strong relationship between schizophrenia and autoimmune disorders has been suggested (Benros et al., 2011).

The modulation of uncontrolled inflammation could be a potential therapeutic adjuvant strategy to antipsychotics. Thus, a recent update has reviewed the randomized controlled trials on the efficacy of anti-inflammatory compounds on schizophrenia, including aspirin, celecoxib, davunetide, estrogens, and minocycline (Sommer et al., 2013).

Alterations in the TLRs pathway have been reported in animal models of depression and depressed individuals (Gárate et al., 2011; Hajebrabimi et al., 2014), and also in schizophrenia at a peripheral level (McKernan et al., 2011; Müller et al., 2012). In stress-based animal models of depression in particular, TLR-4 activation could be caused, at least in part, by increased intestinal permeability and a resultant bacterial translocation of intestinal Gram-bacteria (Gárate et al., 2011, 2013). Despite these findings, a role for other TLR-4 endogenous ligands (DAMPs), such as fibrinogen, heat shock proteins (HSP60-70), or high-mobility-group box protein 1 (HGMB-1) has not been studied.

As commented above, the effects of antipsychotics on pro- and anti-inflammatory pathways are well described, but their direct actions on TLRs remain unexplored. This study aimed to elucidate the effects of paliperidone on stress-induced TLR-4 pathway activation and neuroinflammation and the possible mechanism(s) related (bacterial translocation and/or DAMPs activation).

## Material and Methods

### Animals

72 adult (aged 12 weeks) male Wistar Hannover rats (HsdHan:Wist, Harlan Ibérica) weighing 225–250 g were used. All experimental protocols adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense in accordance with European legislation (D2010/63/UE). The rats were housed with standard temperature and humidity conditions and in a 12 h light/dark cycle (lights on at 08:00 hours) with free access to food and water. All the animals were maintained under constant conditions for 7 days prior to the experiment.

### Drug Administration and Experimental Designs

The atypical antipsychotic paliperidone (3-[2-[4-(6-Fluoro-1,2-benzisoxazol-3-yl)-1-piperidinyl]ethyl]-6,7,8,9-tetrahydro-9-hydroxy-2-methyl-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one; MW 426.48, ref. P0099), LPS (*Escherichia coli* serotype 0111:B4, ref. L2630), and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or as indicated. LPS was dissolved in 0.9% saline and paliperidone was suspended in a saline solution with 0.1% Tween 20 by sonication for 1 min (Veh).

Three experimental designs were performed (see Figure S1 in Supplementary Materials).

The first consisted of an acute model of LPS-induced neuroinflammation (MacDowell et al., 2013). Experimental groups were: (1) Veh + no injection; (2) 1 mg/Kg paliperidone ( $P_1$ ) + no injection; (3) 0.3 mg/Kg paliperidone ( $P_{0.3}$ ) + no injection; (4) Veh + 0.5 mg/Kg LPS; (5)  $P_1$  + 0.5 mg/Kg LPS; and (6)  $P_{0.3}$  + 0.5 mg/Kg LPS. Animals were sacrificed 120 min after first injection.

The second experiment performed was an acute restraint-stress model (6 hours of immobilization; Leza et al., 1998) using a plastic rodent restrainer that allowed for a close fit to rats. Control animals were not subjected to stress, but were handled for a few seconds, and food and water were removed during the period of time that the stressed rats were kept in the restrainer. Veh or paliperidone was given by oral gavage immediately before placing the animal into the restrainer. Groups were: (1) Veh + no stress; (2)  $P_1$  + no stress; (3) Veh + stress; and (4)  $P_1$  + stress.

The last experiment conducted consisted of a chronic restraint-stress model (6 h/day over 21 days; Goldwater et al., 2009). The experimental groups were as follows: (1) Veh + no stress; (2)  $P_1$  + no stress; (3) Veh + stress; and (4)  $P_1$  + stress.

All protocols started at 09:00 h to avoid circadian changes in the stress response. All groups in experiment 1 contained  $n = 5$

animals, in experiment 2 contained  $n = 4$  animals, and in experiment 3 there were  $n = 6$  animals in the control groups and  $n = 7$  in the stress groups.

Animals were killed 120 min after the first injection in experiment 1 and immediately after the restraint session in experiments 2 and 3, using sodium pentobarbital (320 mg/Kg, i.p. Vetoquinol®). All i.p. drugs (or saline) were administered at 2 mL/Kg. The doses of paliperidone (0.3 mg/Kg and 1 mg/Kg) were chosen on the basis of previous *in vivo* determinations of signaling pathways related to oxidative stress, cytokines, and synaptic plasticity in the prefrontal cortex of Wistar rats (Corena-McLeod et al., 2008).

### Preparation of Biological Samples

After decapitation, the brain was removed from the skull and, after careful removal of the meninges and blood vessels, the prefrontal cortical areas (PFC) from both brain hemispheres were excised and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. In some groups of animals, a portion of the descending colon (approx. 2 cm proximal from rectum) was removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (see [Supplementary Material](#) for more details).

### Preparation of Nuclear and Cytosolic Extracts from Tissue Samples

A modified procedure based on the method of Schreiber et al. (1989) was used (see [Supplementary Material](#) for more details).

### Western Blot Analysis

To determine expression levels of TLR-4 and its adapter proteins MyD88 and MD-2, the oxidative/nitrosative and inflammatory mediators iNOS, COX-2, mPGES-1, and TLR-4, the endogenous ligands HMGB1, HSP60, and HSP70, and the brain PFC were homogenized by sonication in 400  $\mu\text{L}$  of PBS (pH = 7) mixed with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Farma) and were centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The same protocol was used to determine the protein levels of the intestinal epithelial cell-derived chemokine CCL28 in colonic samples. In the case of the NF- $\kappa\text{B}$  subunit p65, analyses were carried out in nuclear extracts; for its inhibitory subunit I $\kappa\text{B}\alpha$ , cytosolic extracts were used. Detailed information about sample preparation, protocol, and primary and secondary antibodies can be found in the [Supplementary Material](#).

### RT-PCR Analysis

Total cytoplasmic RNA was prepared from samples of brain PFC using the TRIzol reagent (Invitrogen); aliquots were converted to complementary DNA using random hexamer primers. Quantitative changes in messenger RNA (mRNA) levels were estimated by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR; see [Table S1](#) in [Supplementary Material](#) for details).

### PGE<sub>2</sub> Levels

PGE<sub>2</sub> levels were measured by a commercially available enzyme immunoassay following the manufacturer's instructions (Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA Kit-Monoclonal; Cayman Chemical; see [Supplementary Material](#) for details).

### Nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) Levels

As the stable metabolites of the free radical nitric oxide, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were measured using the Griess method (see [Supplementary Material](#) references for details).

### Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid test for malondialdehyde (MDA) following the method described by Das and Ratty (1987) with some modifications (see [Supplementary Material](#) references for details).

### Plasma LPS Levels

LPS levels were determined using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Hycult Biotech; see [Supplementary Material](#) for more details).

### Immunoglobulin A Determination

Colonic immunoglobulin A (IgA) levels were determined using a commercially available enzyme immunoassay kit (Bethyl Laboratories; see [Supplementary Material](#) for more details).

### Protein Assay

Protein levels were measured using the Bradford method based on the principle of protein-dye binding (see [Supplementary Material](#) references for details).

### Statistical Analyses

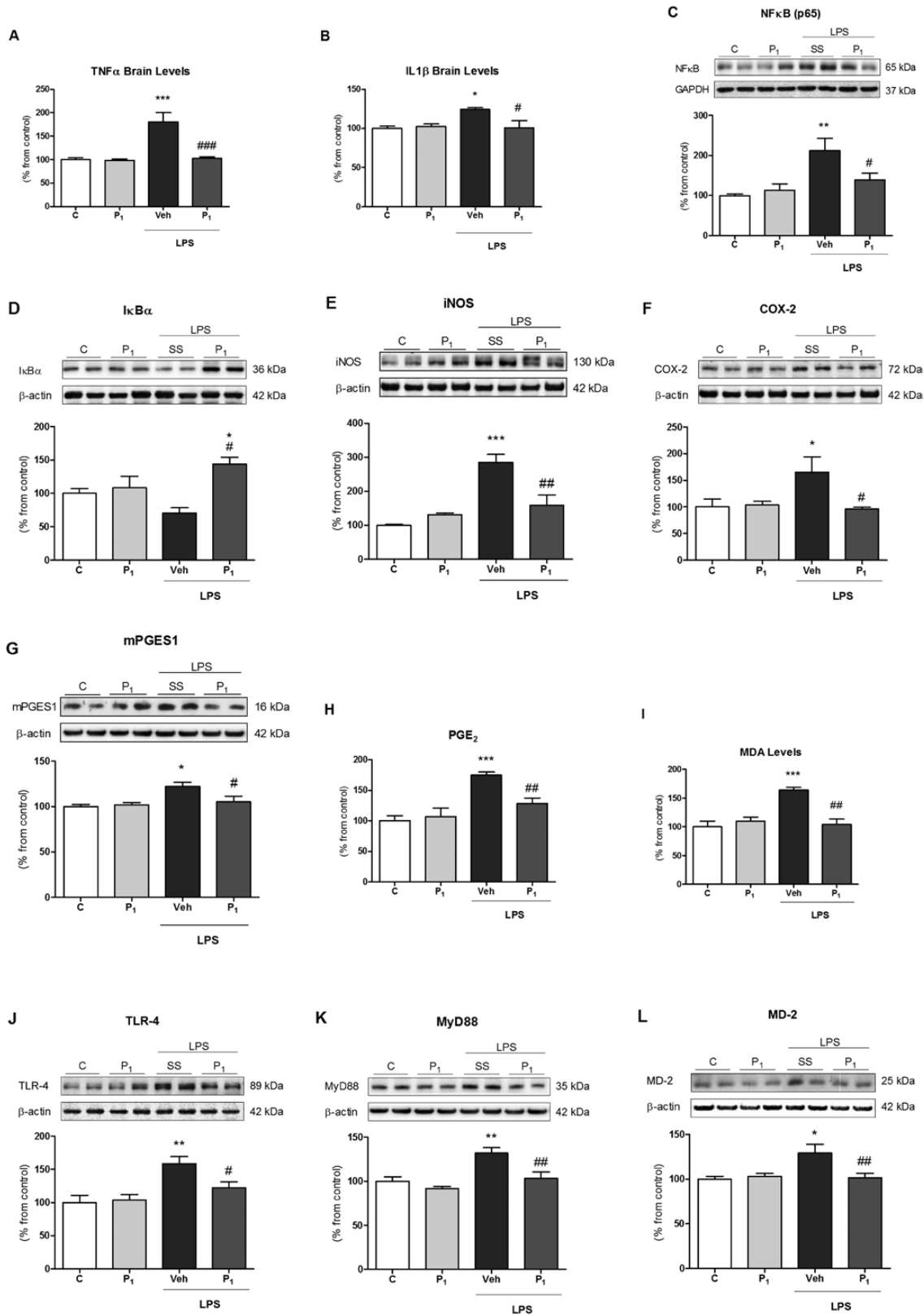
Data in text and figures are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. For multiple comparisons, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls post hoc test was used to compare all pairs of means between groups. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant. All the results of the one-way ANOVA analyses ( $F$  values and  $df$ s) are included in [Table S2](#) in the [Supplementary Material](#).

## Results

### Effects of Paliperidone on Brain TLR-4 Signaling Pathway Activation and Neuroinflammation After Acute LPS Exposure

Previously, we described the anti-inflammatory effects of risperidone in a LPS model of neuroinflammation (MacDowell et al., 2013). Now we aimed to corroborate whether its active metabolite, paliperidone, also presents this anti-inflammatory profile. LPS elicited a proinflammatory response characterized by increased levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  ([Figure 1A](#) and [B](#)) and nuclear NF- $\kappa\text{B}$  ([Figure 1C](#)) and degradation of the NF- $\kappa\text{B}$  inhibitory protein I $\kappa\text{B}\alpha$  in cytosol ([Figure 1D](#)). As a direct consequence of NF- $\kappa\text{B}$  activation, there was an increase of proinflammatory enzymes iNOS, COX-2, and m-PGES-1 ([Figure 1E–G](#)), whose activity lead to the over-accumulation of proinflammatory and oxidative/nitrosative stress mediators, such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and MDA (index of lipid peroxidation; [Figure 1H](#) and [I](#)). As in the case of risperidone (MacDowell et al., 2013), the pre-administration of paliperidone (1 mg/Kg) fully prevented the activation of this proinflammatory/oxidant pathway in rat PFCs by LPS ([Figure 1A–I](#)). All these results were paralleled at the mRNA level by RT-PCR (see [Figure S2](#) in [Supplementary Material](#)).

Considering that LPS is the main ligand of TLR-4, we checked whether paliperidone was able to interact with the elements of its signaling pathway. LPS exposure upregulated TLR-4, MyD88, and MD-2 at the protein ([Figure 1J–L](#)) and mRNA levels (see [Figure S2](#) in [Supplementary Material](#)). Paliperidone prevented the activation of the TLR-4 signaling pathway ([Figure 1A–I](#)) in rat PFC. All these results were paralleled at the mRNA level by RT-PCR (see [S2](#) in [Supplementary Material](#)). None of the parameters measured changed between control and control animals pre-treated with paliperidone ([Figure 1](#) and [Supplementary Figure S2](#)).



**Figure 1.** Paliperidone effects on lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation and toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway upregulation in rat prefrontal cortices. Analysis of the pro-inflammatory cytokines levels of tumour necrosis factor TNFα (A) and interleukin IL1β (B); protein levels of NF-κB (p65; C), NF-κB inhibitory protein IκBα (D), iNOS (E), COX-2 (F), m-PGES-1 (G); pro-inflammatory PGE<sub>2</sub> levels (H) and lipid peroxidation levels (malondialdehyde [MDA]; I); protein levels of TLR-4 (J), MyD88 (K), and MD-2 (L) in the prefrontal cortices of vehicle (Veh) + no injection (C), 1 mg/Kg paliperidone (P<sub>1</sub>) + no injection, Veh + LPS, and 1 mg/Kg paliperidone (P<sub>1</sub>) + LPS. The densitometric data of the respective bands of interest are normalized by β-actin or GAPDH (lower band). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 vs. control; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 vs. LPS. One-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc test. Data represent the mean ± standard error of the mean.



In a parallel study, we checked whether a lower dose of paliperidone (0.3 mg/Kg) was able to produce similar anti-inflammatory/antioxidant actions in the LPS-induced proinflammatory response. In general, paliperidone effects on the TLR-4 pathway were well conserved, and only some of the inflammatory (IkB $\alpha$ , COX-2, and m-PGES-1 expression) and oxidative (MDA levels) parameters were not altered (see Table S3 for details in Supplementary Material).

Finally, we studied whether there are differences in the most representative inflammatory parameters (TLR-4, NF $\kappa$ B, and COX-2 expression, and TNF- $\alpha$  levels) between a single injection control group (Veh;  $n = 5$ ) and a control group receiving two injections (Veh+saline;  $n = 5$ ), trying to check an effect of the dual injections in the LPS groups as compared to the single injection used for the control groups. As can be seen in Table S4 in Supplementary Material, there were no differences between groups, suggesting that the effect of LPS is not dependant on whether animals have been injected once or twice.

### Effects of Paliperidone on Acute Restraint Stress-Induced Activation of the TLR-4 Signaling Pathway and Neuroinflammation

Our next objective was to evaluate whether the effects of paliperidone could be extended to other inflammatory/immune challenges also related to innate immune system activation, such as restraint stress exposure (Gárate et al., 2011, 2013).

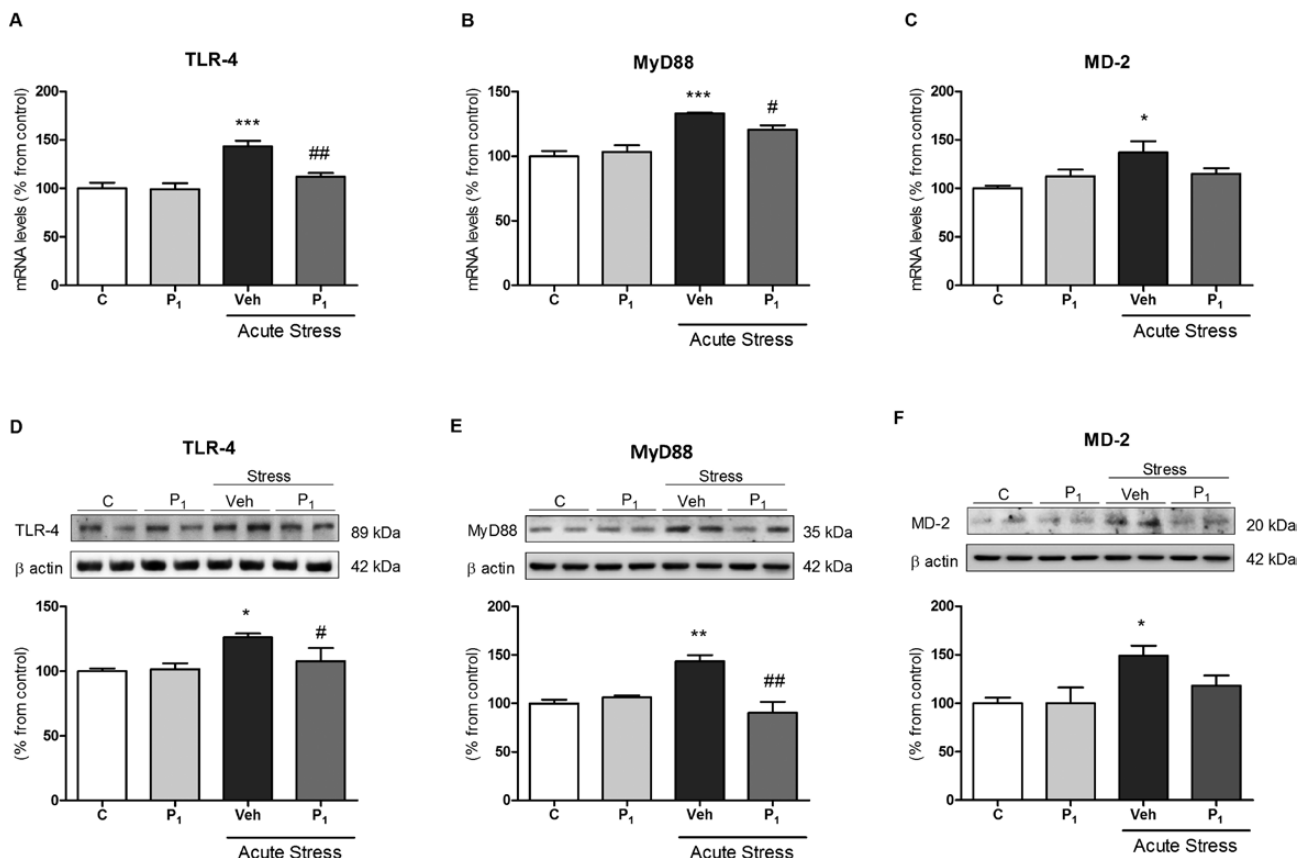
Considering that stress contributes to the aetiology of psychotic disease, the study of possible effects of paliperidone in stress models could be relevant for therapeutic purposes.

Acute-restraint stress upregulated TLR-4, MyD88, and MD-2 proteins and mRNA in rat PFCs, and these effects were normalized to control levels by paliperidone (Figure 2A–F), except for the stress induced MD-2 increase. Paliperidone did not alter the TLR-4 signaling pathway in control conditions (Figure 2A–F).

Next, we explored whether paliperidone-blocking effects on the TLR-4 signaling pathway were extensive to cytokines and NF- $\kappa$ B-driven proinflammatory pathways in rat prefrontal cortices. As in the case of LPS, acute restraint stress elicits a brain increase of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Figure S3A and B) and nuclear NF- $\kappa$ B (Figure S3C). There is an increase of iNOS, COX-2, and m-PGES-1 (Figure S3E–G), whose activity augmented the levels of proinflammatory PGE<sub>2</sub> and the oxidative/nitrosative stress markers MDA and NO<sub>2</sub> (Figure S3H–J). Pre-treatment with paliperidone (1 mg/Kg) prior to acute restraint-stress exposure fully prevented the activation of this proinflammatory/oxidant pathway in rat brains (Figure S3A–J). Even paliperidone increased IkB $\alpha$  expression in cytosol (Figure S3D).

None of the proinflammatory/oxidant elements measured were modified in control animals receiving paliperidone (Figure S3A–J).

These results were paralleled at the mRNA level (see Figure S4 in Supplementary Material), with the exception of COX-2.



**Figure 2.** Paliperidone effects on acute restraint stress-induced toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling pathway activation in rat prefrontal cortices. Messenger RNA (mRNA) relative levels of TLR-4 (A), MyD88 (B), and MD-2 (C). Protein levels of TLR-4 (D), MyD88 (E), and MD-2 (F) in prefrontal cortices of vehicle (Veh) + no stress (C), 1 mg/Kg Paliperidone (P<sub>1</sub>) + no stress, Veh + stress (6 hrs), and 1 mg/Kg Paliperidone (P<sub>1</sub>) + stress. The densitometric data of the respective bands of interest are normalized by  $\beta$ -actin (lower band). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. stress. One-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc test. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.

## Effects of Paliperidone on Chronic Restraint Stress-Induced Activation of the TLR-4 Signaling Pathway and Neuroinflammation

The effects of long-lasting antipsychotic medication on the inflammatory/innate immune system are partly unknown. Thus, our last objective was to explore the effects of daily paliperidone in a standardized protocol of chronic restraint stress (6 hours/day during 21 consecutive days).

Chronic restraint stress increased TLR-4, MyD88, and MD-2 mRNA and protein (Figure 3A–F) levels compared to control conditions. Daily paliperidone completely blocked stress-induced stimulatory effects. Chronic paliperidone did not alter the TLR-4 signaling pathway in control conditions.

We also checked whether paliperidone's blocking effects on the TLR-4 signaling pathway also extended to cytokines and the NF- $\kappa$ B-driven proinflammatory/oxidant pathway in brain rat PFCs in chronic conditions of stress and treatment.

Repeated restraint stress enhanced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Figure S5A and B) levels and nuclear NF- $\kappa$ B p65 subunit expression (Figure S5C), as well as the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  (Figure S5D). Also, there was an increase of iNOS and COX-2 (Figure S5E and F), whose activity augmented PGE<sub>2</sub> and MDA levels, but not an increase of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Figure S5H–J). Daily administration of paliperidone inhibited chronic stress-induced proinflammatory/oxidant effects, except for the case of m-PGES-1 protein expression and

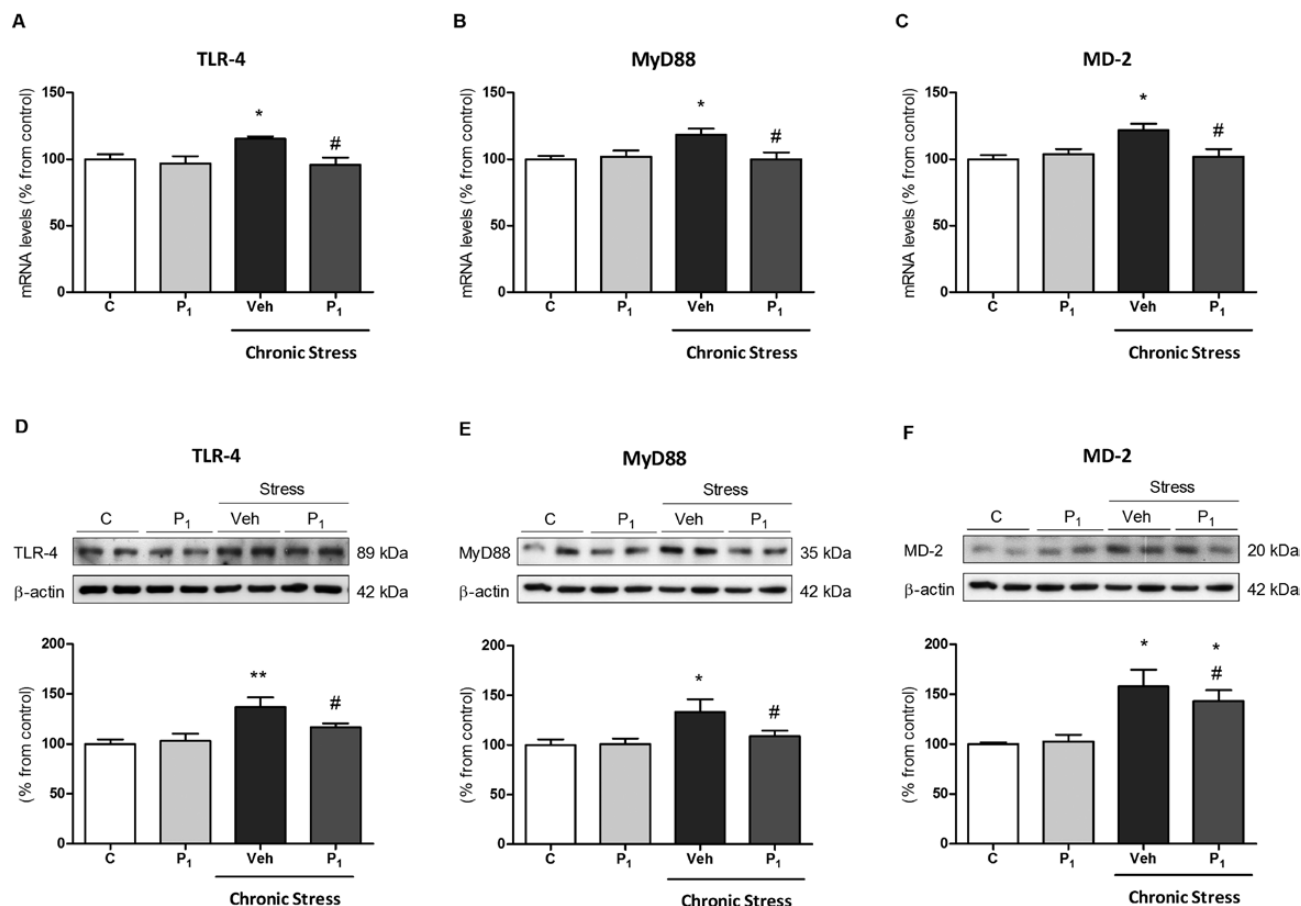
PGE<sub>2</sub> levels in rat prefrontal cortices. m-PGES-1 did not appear to be modified by chronic stress (Figure S5G).

At the mRNA level, chronic stress induced the expression of NF- $\kappa$ B, COX-2, and m-PGES-1. Paliperidone blocked the stress effects on NF- $\kappa$ B and m-PGES-1 (see Figure S6), and induced a marked increase of I $\kappa$ B $\alpha$  in stress conditions.

## Effects of Paliperidone on the Potential Regulatory Mechanisms of Stress-Induced TLR-4 Activation in Brain PFC (I)

As previously shown in other stress models (Gárate et al., 2011, 2013), increased systemic levels of LPS from translocation of colonic bacteria is a mechanism responsible, at least in part, for the TLR-4 activation and neuroinflammation found. Our last objective was to explore whether the inhibitory effects of paliperidone on central TLR-4 activation were related to the prevention of stress-induced increased inflammation and intestinal permeability, and the resultant bacterial translocation to systemic circulation.

Acute restraint stress increased LPS plasma levels, but this was prevented by paliperidone pre-treatment (Figure 4A). To clarify whether the bacterial translocation observed after acute stress exposure was related to the intestinal dysfunction caused by inflammation, we decided to study some inflammatory-related parameters in this organ. Stress exposure upregulated



**Figure 3.** Paliperidone effects on chronic restraint stress-induced toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling pathway activation in rat prefrontal cortices. Messenger RNA (mRNA) relative levels of TLR-4 (A), MyD88 (B), and MD-2 (C). Protein levels of TLR-4 (D), MyD88 (E), and MD-2 (F) in the prefrontal cortices of vehicle (Veh) + no stress (C), 1 mg/Kg Paliperidone (P<sub>1</sub>) + no stress, Veh + stress (6 hrs/day during 21 days), 1 mg/Kg Paliperidone (P<sub>1</sub>) + stress. The densitometric data of the respective bands of interest are normalized by  $\beta$ -actin (lower band). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs. control; # $p$  < 0.05 vs. stress. One-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc test. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.

iNOS and COX-2 protein expression in colon samples (Figure 4B and C). Paliperidone treatment prevented iNOS activation and showed a tendency to decrease COX-2 levels (Figure 4B and C).

In addition, we quantified the chemokine CCL28, also known as mucosae-associated epithelial chemokine, which regulates the migration of Immunoglobulin-expressing cells. Immunoglobulin A represents a first line of defence against pathogens, and a decrease in its amount in the colon contributes to bacterial translocation. Neither IgA levels nor CCL28 protein expression in colonic samples were modified after acute stress exposure or by paliperidone treatment (Figure 4D and E).

Next, we explored the effects of daily paliperidone administration in chronic restraint-stress exposure (6 hours/day during 21 consecutive days). As in acute conditions, chronic stress induced an increase in the LPS plasma levels (Figure 4F) and iNOS expression in the colon (Figure 4G). COX-2 expression was not modified in any condition (Figure 4H). Paliperidone prevented stress-induced LPS level increases and normalized iNOS protein to control levels (Figure 4F-H).

Contrarily to acute stress conditions, chronic stress decreased IgA levels and increased CCL28 protein in colonic samples (Figure 4I and J). Paliperidone did not significantly alter both stress-induced effects (Figure 4I and J).

## Effects of Paliperidone on the Potential Regulatory Mechanisms of Stress-Induced TLR-4 Activation in Brain PFC (II)

TLR-4 recognizes a number of unspecific endogenous molecules released from damaged tissues, such as heat shock proteins 60 and 70 (HSP60-70) and High-mobility group protein box-1 (HGMB-1). The activation of DAMPs could be a complementary regulatory mechanism suitable to be regulated by the treatment with paliperidone in our stress conditions.

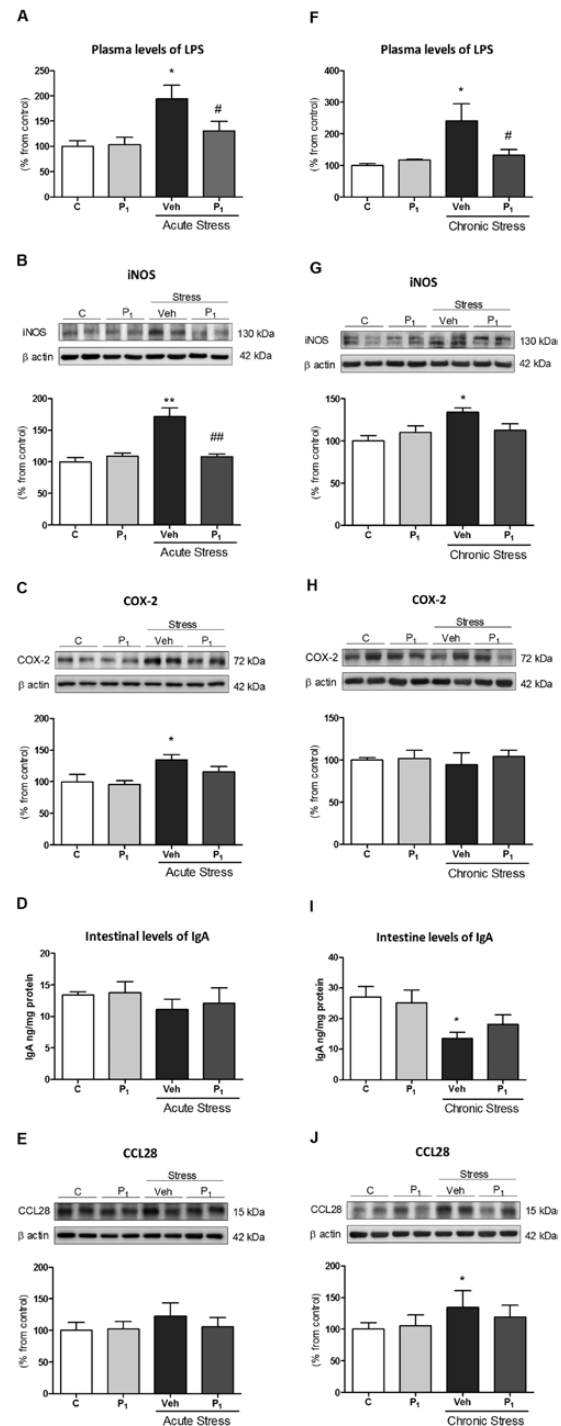
Acute restraint stress elicited an increase in HSP70 and HGMB-1 mRNA and protein, respectively (Figure 5A-D). Paliperidone treatment prevented stress-induced upregulation of HSP70 and HGMB-1 only at protein level (Figure 5B and D). HSP60 was not affected in any condition (Figure 5E and F).

Finally, we studied the effects of daily paliperidone treatment in chronic restraint stress conditions (6 hours/day during 21 consecutive days). Chronic stress upregulated the mRNA levels of HSP60 but it had no effect on HSP70 and HGMB-1. The chronic administration of paliperidone did not prevent the stress-induced HSP60 levels, but increased HSP70 mRNA levels compared to control and stress conditions (Figure 5G and H).

## Discussion

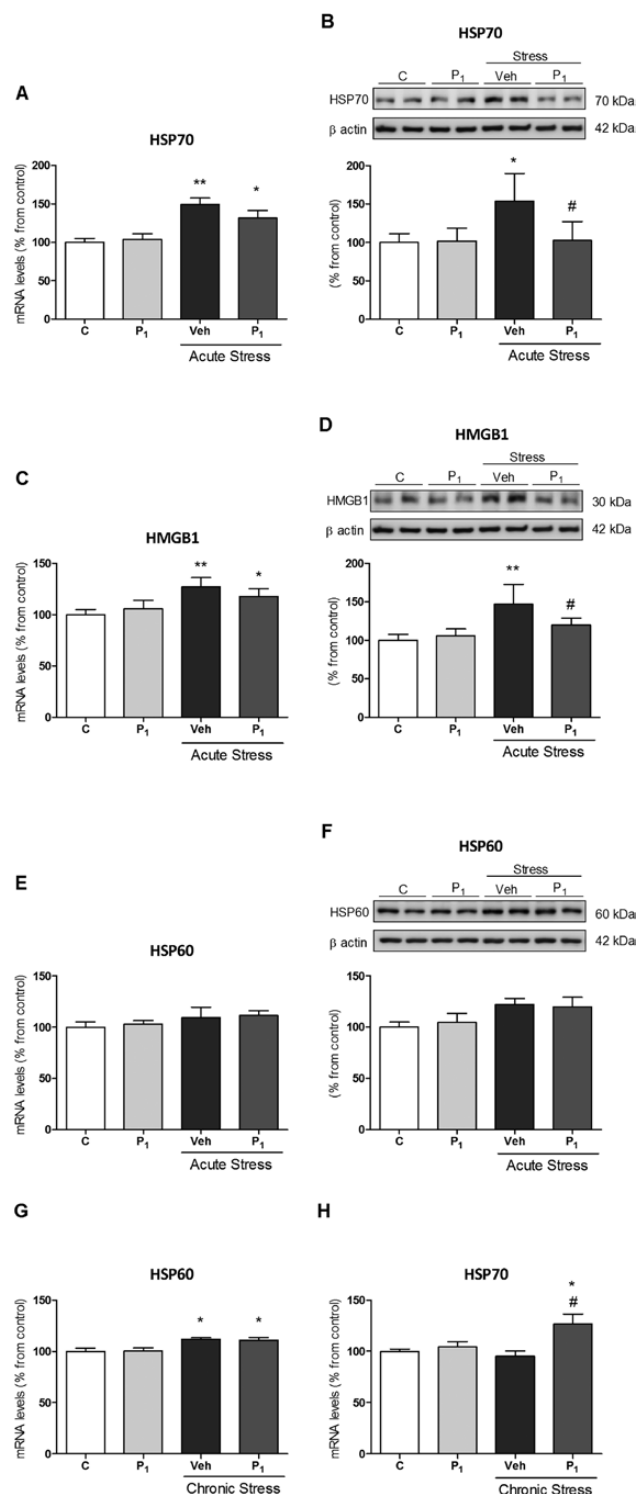
To our knowledge, the results of the present study provide the first evidence supporting a regulatory role of the antipsychotic paliperidone in the activation of the innate immune receptor TLR-4 and the subsequent neuroinflammatory response in the PFCs of rats submitted to LPS challenge and to acute/chronic restraint stress. A deeper study of the possible mechanisms implicated shows that paliperidone pre-treatment regulates stress-induced increased intestinal inflammation/dysfunction and plasma LPS levels. In addition, paliperidone also prevents the activation of the endogenous, unspecific ligands of TLR-4 HSP70 and HGMB-1, at least in acute stress conditions.

Although the archetypical point of view considers schizophrenia as a neuropsychiatric pathology characterized by increased dopamine function, the potential of paliperidone as a regulator of the innate immune system/inflammation at the



**Figure 4.** Paliperidone effects on the potential regulatory mechanisms of acute and chronic stress-induced toll-like receptor-4 (TLR-4) activation I. Lipopolysaccharide (LPS) plasma levels (A); intestinal levels of inflammatory proteins iNOS (B) and COX-2 (C); intestinal levels of immunoglobulin A (IgA; D); and protein levels of CCL28 (E) in vehicle (Veh) + no stress (C), 1 mg/Kg paliperidone (P<sub>1</sub>) + no stress, and animals exposed to acute restraint stress (6h) with (P<sub>1</sub>) or Veh paliperidone pre-treatment. LPS plasma levels (F); intestinal levels of inflammatory proteins iNOS (G) and COX-2 (H); intestinal levels of immunoglobulin A (IgA; I); and protein levels of CCL28 (J) in Veh + no stress (C), 1 mg/Kg paliperidone (P<sub>1</sub>) + no stress, and animals exposed to chronic restraint stress (6 hrs/day during 21 days) with (P<sub>1</sub>) or Veh paliperidone pre-treatment. The densitometric data of the respective bands of interest are normalized by  $\beta$ -actin (lower band). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  vs. control; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.001$  vs. stress. One-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc test. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.





**Figure 5.** Paliperidone effects on the potential regulatory mechanisms of acute and chronic stress-induced toll-like receptor-4 (TLR-4) activation II. Messenger RNA (mRNA) and protein levels of HSP70 (A and B), HMGB1 (C and D), and HSP60 (E and F) in vehicle (Veh) + no stress (C), 1 mg/Kg paliperidone (P<sub>1</sub>) + no stress, and animals exposed to acute restraint stress (6 hrs) with (P<sub>1</sub>) or Veh paliperidone pre-treatment. Messenger RNA (mRNA) relative levels of HSP60 (G) and HSP70 (H) in Veh + no stress (C), 1 mg/Kg Paliperidone (P<sub>1</sub>) + no stress, and animals exposed to chronic restraint stress (6 hrs/day during 21 days) with (P<sub>1</sub>) or Veh Paliperidone pre-treatment. The densitometric data of the respective bands of interest are normalized by  $\beta$ -actin (lower band). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control; # $p < 0.05$  vs. stress. One-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc test. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.

CNS level could be relevant to explain the therapeutic benefits of its use for the treatment of psychosis beyond its classical effects on dopamine and serotonin neurotransmission. Our results agree with previous evidence, which has pointed to an anti-inflammatory effect of antipsychotics as one of the beneficial effects of these drugs in patients with schizophrenia. In particular, the stimulation of anti-inflammatory cytokines seems to be a mechanism elicited by several antipsychotics to regulate uncontrolled and potentially deleterious inflammation in schizophrenia (Sugino et al., 2009). It has been shown that risperidone normalizes elevated inflammatory mediators (cytokines and PGs) and restores anti-inflammatory pathways in murine models of neuroinflammation (MacDowell et al., 2013). Chronic administration of olanzapine or clozapine also reduces proinflammatory PGE<sub>2</sub> concentration in the rat brain (Cheon et al., 2011). A recent study using a SNP-based analysis of neuroactive pathways implicated PGE<sub>2</sub> as a mediator of the effects of risperidone (Adkins et al., 2012).

There is not much evidence clarifying which receptor binding profile of risperidone/paliperidone leads to its anti-inflammatory actions. In this vein, some authors have tested the effects of several specific agonists and antagonists on neurotransmitter receptors that were related to the basic mechanism of paliperidone. These investigations showed that only ketanserin (5-HT<sub>2</sub> antagonist) and prazosin ( $\alpha_1$  antagonist) had anti-inflammatory effects in the same LPS induced-inflammation model (Sugino et al., 2009). Further studies are required to explain how the chemical structure of paliperidone could affect these immune targets, or if the effect is actually indirect and mediated by the dopaminergic blockade.

Our results acquire special relevance considering that alterations in the TLR pathway have been previously reported in schizophrenia at the peripheral level (McKernan et al., 2011; Müller et al., 2012). Furthermore, there is some evidence of discordant patterns of bacterial translocation markers in schizophrenia, possibly related to an activated innate immune state throughout the stimulation of TLRs (Severance et al., 2013). However, a direct nexus between gut barrier dysfunction, bacterial translocation, and TLR-4 pathway activation has not been demonstrated yet in neuropsychiatric patients.

In our stress conditions, the treatment with paliperidone produces anti-inflammatory effects at a gastrointestinal level. These specific actions deserve further investigation, considering that patients with schizophrenia quite often present gut problems, and irritable bowel syndrome commonly occurs in mental disorders (Wei and Hemmings, 2005). Some risk factors for schizophrenia are related to the gastrointestinal system, such as gluten and milk casein hypersensitivity or *Toxoplasma gondii* infection (Dickerson et al., 2010; Severance et al., 2013). Indeed, there is a clear association between schizophrenia and the autoimmune condition of celiac disease (Kalaydjian et al., 2006): patients with schizophrenia present complement C1q formation of immune complexes with milk casein and wheat gluten that could be considered markers for gastrointestinal inflammation (Dickerson et al., 2010). Based on these findings, gut conditions should be taken into account in future pharmacologic and patho-physiological studies of schizophrenia, but always considering the myriad of gastrointestinal and metabolic alterations produced by some antipsychotics as possible confounding factors. As a recent example, chronic olanzapine administration altered gut microbiota in female rats in a mechanism related to olanzapine-induced weight gain and associated metabolic syndrome (Davey et al., 2013). In light of current knowledge, schizophrenia and other psychosis-related pathologies could not be

considered as predominantly immune or gut disorders, but our results and others suggest that adjuvant strategies dealing with these alterations could present therapeutic benefits to explore in the future.

Other potential TLR-4 regulatory molecules modulated by paliperidone, especially in acute stress conditions, are HSP70 and HGMB1. HSP70 is a chaperone involved in neurodevelopment and neuroprotection, and its defective production, caused by stress during neuronal development, could have a role in the pathophysiology of psychotic disease (Bates et al., 1996). Furthermore, an association between HSP70 gene polymorphisms and clinical variations of schizophrenia (Kim et al., 2008; Pae et al., 2009) and in first-psychotic-episode, drug-naïve schizophrenic patients (Bozidis et al., 2014) also exists. Our results are in agreement with previous findings showing an inhibitory effect of risperidone and haloperidol on HSP70 protein upregulation in MK-801-treated rat C6 glioma cells (Roh et al., 2008). Other authors have found differential levels of antibodies against HSP60-70 in schizophrenic subjects (Kim et al., 2001). The ability of paliperidone to upregulate HSP70 mRNA levels in chronic stress conditions is a putative mechanism of neuroprotection that deserves further investigation. On the other hand, this activation could be considered a CNS homeostatic mechanism of response against chronic paliperidone treatment in stress conditions. In this vein, some authors have recently reported that the hydroxylamine HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics (Literáti-Nagy et al., 2012).

HGMB-1 is a chromatin-binding protein that facilitates the transcription on genes involved in neurite outgrowth and cell migration (Thomas and Travers, 2001). In addition, HGMB-1 has been recognized as a danger signal that, once activated, induces TLR-4 derived neuroinflammation after injury (i.e., alcohol abuse or ischaemic stroke; Yang et al., 2010; Crews et al., 2013). Taking into account that schizophrenia is considered by some authors as a neurodevelopmental and inflammation-related disorder; the original regulatory effects of paliperidone on increased HGMB-1 levels in stressed rats are especially remarkable in the search for novel therapeutic targets, considering that HGMB-1 expression is a risk factor for memory impairment, chronic neurodegeneration, and progression of neuroinflammation (Fang et al., 2012).

The use of stress-based animal models is relevant to study possible mechanisms involved in the patho-physiology of psychotic disease. Stress is a major contributor to the aetiology (as a risk factor) and progression of psychotic illness in its multiple clinical and subclinical manifestations (Bradley and Dinan, 2010). In fact, stress exposure is present in almost all psychiatric diseases, and its effects on the immune/endocrine system need to be elucidated and controlled (García-Bueno et al., 2008). Future translational research should corroborate the effects of paliperidone on the TLR-4 pathway and its regulatory mechanisms in animal models of schizophrenia and, finally, in schizophrenic or psychotic patients.

There has been renewed interest in immune/inflammatory changes and their associated oxidative/nitrosative consequences as key pathophysiological mechanisms in schizophrenia. In particular, there is growing evidence from animal models supporting a decisive role for pre-perinatal infections in inducing maternal immune activation and oxidative/nitrosative stress that can lead to neurodevelopmental damage and behavioral abnormalities in progeny (Venkatasubramanian and Debnath, 2013). Toll-like receptors could participate decisively in these alterations of the immune system. Some

of the current pharmacological approaches try to deal with these processes (mainly treatments with antioxidants or anti-inflammatory drugs as add-ons to antipsychotics; Sommer et al., 2013). Our results support the idea that some of the neuroprotective effects afforded by paliperidone may be related to its ability to regulate stress-induced alterations on the innate immune/inflammatory system. Further investigation is needed to determinate the state of the innate immune system in the different states of psychotic disease and whether the pharmacological modulation of the molecular mechanisms regulating the TLR-4 dependent neuroinflammation (bacterial translocation of gut Gram-negative microflora, DAMPs) is useful for the management of the symptomatology of psychotic pathologies.

## Supplementary Material

For supplementary material accompanying this paper, visit <http://www.ijnp.oxfordjournals.org/>

## Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF07-63138), the Instituto de Salud Carlos III (FIS 10/00123 & 13/1102), Centro de Investigación en Red de Salud Mental, CIBERSAM, Foundation Santander-UCM (GR 58/08), and Fundación Mutua Madrileña 2011. Dr Caso is a Juan de la Cierva post-doctoral fellow (MEC). Dr García-Bueno is a Ramón y Cajal post-doctoral fellow (MEC).

## Statement of Interest

None.

## References

- Adkins DE, Khachane AN, McClay JL, Aberg K, Bukszár J, Sullivan PF, van den Oord EJ (2012) SNP-based analysis of neuroactive ligand-receptor interaction pathways implicates PGE2 as a novel mediator of antipsychotic treatment response: data from the CATIE study. *Schizophr Res* 135:200–201.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801.
- Bates PR, Hawkins A, Mahadik SP, McGrath JJ (1996) Heat stress lipids and schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55:101–107.
- Benros ME, Nielsen PR, Nordentoft M, Eaton WW, Dalton SO, Mortensen PB (2011) Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: a 30-year population-based register study. *Am J Psych* 168:1303–1310.
- Bozidis P, Hyphantis T, Mantas C, Sotiropoulou M, Antypa N, Andreoulakis E, Serretti A, Mavreas V, Antoniou K. (2014) HSP70 polymorphisms in first psychotic episode drug-naïve schizophrenic patients. *Life Sci* 100:133–137.
- Bradley AJ, Dinan TG (2010) A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *J Psychopharmacol* 24:91–118.
- Brown AS, Derkits EJ (2010) Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psych* 167:261–280.
- Cheon Y, Park JY, Modi HR, Kim HW, Lee HJ, Chang L, Rao JS, Rapoport SI (2011) Chronic olanzapine treatment decreases arachidonic acid turnover and prostaglandin E(2) concentration in rat brain. *J Neurochem* 119:364–376.

- Corena-McLeod Mdel P, Oliveros A, Charlesworth C, Madden B, Liang YQ, Boules M, Shaw A, Williams K, Richelson E. (2008) Paliperidone as a mood stabilizer: a pre-frontal cortex synaptoneurosomal proteomics comparison with lithium and valproic acid after chronic treatment reveals similarities in protein expression. *Brain Res* 1233:8–19.
- Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, Zou J (2013) High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 73:602–612.
- Das NP, Ratty AK (1987) Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, and codeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 37:258–264.
- Davey KJ, Cotter PD, O'Sullivan O, Crispie F, Dinan TG, Cryan JF, O'Mahony SM (2013) Antipsychotics and the gut microbiome: olanzapine-induced metabolic dysfunction is attenuated by antibiotic administration in the rat. *Transl Psychiatry* 3:e309.
- Dickerson F, Stallings C, Origoni A, Vaughan C, Khushalani S, Leister F, Yang S, Krivogorsky B, Alaedini A, Yolken R (2010) Markers of gluten sensitivity and celiac disease in recent-onset psychosis and multi-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 68:100–104.
- Fang P, Schachner M, Shen YQ (2012) HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 45:499–506.
- Fischer M, Ehlers M (2008) Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 1143:21–34.
- Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Bravo L, Berrocoso E, Caso JR, Micó JA, Leza JC (2011) Origin and consequences of brain toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation* 8:151.
- Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, Micó JA, Leza JC (2013) Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry* 73:32–43.
- García-Bueno B, Caso JR, Leza JC (2008) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1136–1151.
- Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, Bloss EB, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2009) Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience* 164:798–808.
- Hajebrahimi B, Bagheri M, Hassanshahi G, Nazari M, Bidaki R, Khodadadi H, Arababadi MK, Kennedy D. B, Bagheri M, Hassanshahi G, Nazari M, Bidaki R, Khodadadi H, et al (2014) The adapter proteins of TLRs, TRIF and MYD88, are upregulated in depressed individuals. *Int J Psychiatry Clin Pract* 18:41–44.
- Hanke ML, Kielian T (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci* 121:367–387.
- Kalaydjian AE, Eaton W, Cascella N, Fasano A (2006) The gluten connection: the association between schizophrenia and celiac disease. *Acta Psychiatr Scand* 113:82–90.
- Kim JJ, Lee SJ, Toh KY, Lee CU, Lee C, Paik IH (2001) Identification of antibodies to heat shock proteins 90kDa and 70kDa in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 52:127–135.
- Kim JJ, Mandelli L, Lim S, Lim HK, Kwon OJ, Pae CU, Serretti A, Nimgaonkar VL, Paik IH, Jun TY. (2008) Association analysis of heat shock protein 70 gene polymorphisms in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258:239–244.
- Kirkpatrick B, Miller BJ (2013) Inflammation and schizophrenia. *Schizophr Bull* 39:1174–1179.
- Lampron A, Elali A, Rivest S (2013) Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and its environment. *Neuron* 78:214–232.
- Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW (1998) The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharm Exp Ther* 286:1397–1403.
- Literáti-Nagy Z1, Tory K, Literáti-Nagy B, Kolonics A, Török Z, Gombos I, Balogh G, Vígh L Jr, Horváth I, Mandl J, Sümegi B, Hooper PL, Vígh L (2012) The HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics. *Cell Stress Chaperones* 17:517–521.
- MacDowell KS, García-Bueno B, Madrigal JL, Parellada M, Arango C, Micó JA, Leza JC (2013) Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:121–135.
- Madrigal JL, García-Bueno B, Caso JR, Pérez-Nievas BG, Leza JC (2006) Stress-induced oxidative changes in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:561–568.
- McKernan DP, Dennison U, Gaszner G, Cryan JF, Dinan TG (2011) Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype. *Transl Psychiatry* 1:e36.
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ (2000) The biology of toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:219–232.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135–145.
- Meyer U (2013) Developmental neuroinflammation and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 42:20–34.
- Meyer U, Schwarz MJ, Muller N (2011) Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol Ther* 132:96–110.
- Müller N, Wagner JK, Krause D, Weidinger E, Wildenauer A, Obermeier M, Dehning S, Gruber R, Schwarz MJ (2012) Impaired monocyte activation in schizophrenia. *Psychiatry Res* 198:341–346.
- Pae CU, Drago A, Kim JJ, Mandelli L, De Ronchi D, Serretti A (2009) The impact of heat shock protein 70 gene variations on clinical presentation and outcome in schizophrenic inpatients. *Neuropsychobiology* 59:135–141.
- Piccinini AM, Midwood KS (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signaling. *Mediators Inflamm*. Advance online publication. Retrieved 2010. doi: 10.1155/2010/672395.
- Roh K, Roh S, Yang BH, Lee JS, Chai YG, Choi MR, Park YC, Kim DJ, Kim D, Choi J, Kim SH (2008) Effects of haloperidol and risperidone on the expression of heat shock protein 70 in MK-801-treated rat C6 glioma cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1793–1797.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419.
- Severance EG, Gressitt KL, Stallings CR, Origoni AE, Khushalani S, Leweke FM, Dickerson FB, Yolken RH (2013) Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia. *Schizophr Res* 148:130–137.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777–1782.
- Sommer IE, van Westrhenen R, Begemann MJ, de Witte LD, Leucht S, Kahn RS (2013) Efficacy of anti-inflammatory agents to improve symptoms in patients with schizophrenia: an update. *Schizophr Bull* 40:181–191.

- Sugino H, Futamura T, Mitsumoto Y, Maeda K, Marunaka Y (2009) Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:303–307.
- Stahl SM (2010) Psychiatric stress testing: novel strategy for translational psychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 35:1413–1414.
- Suvisaari J, Mantere O (2013) Inflammation theories in psychotic disorders: a critical review. *Infect Disord Drug Targets* 13:59–70.
- Takeuchi O, Akira S (2001) Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 1:625–635.
- Thomas JO, Travers AA (2001) HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 167–174.
- Venkatasubramanian G, Debnath M (2013) The TRIPS (toll-like receptors in immuno-inflammatory pathogenesis) hypothesis: a novel postulate to understand schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 44:301–311.
- Wei J, Hemmings GP (2005) Gene, gut and schizophrenia: the meeting point for the gene-environment interaction in developing schizophrenia. *Med Hypotheses* 64:547–52.
- Yang QW, Xiang J, Zhou Y, Zhong Q, Li JC (2010) Targeting HMGB1/TLR4 signaling as a novel approach to treatment of cerebral ischemia. *Front Biosci (Schol Ed)* 2:1081–1091.



## Pro-/Anti-inflammatory Dysregulation in Patients With First Episode of Psychosis: Toward an Integrative Inflammatory Hypothesis of Schizophrenia

Borja García-Bueno<sup>†,1</sup>, Miquel Bioque<sup>†,2</sup>, Karina S. Mac-Dowell<sup>†,1</sup>, M. Fe Barcones<sup>†,3</sup>, Monica Martínez-Cengotitabengoa<sup>4</sup>, Laura Pina-Camacho<sup>5</sup>, Roberto Rodríguez-Jiménez<sup>6</sup>, Pilar A. Sáiz<sup>7</sup>, Carmen Castro<sup>8</sup>, Amalia Lafuente<sup>9</sup>, Javier Santabábara<sup>3,10</sup>, Ana González-Pinto<sup>4</sup>, Mara Parellada<sup>5</sup>, Gabriel Rubio<sup>6</sup>, M. Paz García-Portilla<sup>7</sup>, Juan A. Micó<sup>11</sup>, Miguel Bernardo<sup>12</sup>, and Juan C. Leza<sup>\*,1</sup>

CIBERSAM and: <sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University and Instituto de Investigación Sanitaria-IIS-Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain; <sup>2</sup>Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Hospital Clínico Universitario, Zaragoza, Spain; <sup>4</sup>Hospital Universitario de Alava (sede Santiago) Universidad Nacional de Educación a Distancia, Vitoria, Spain; <sup>5</sup>Child and Adolescent Psychiatry Department, IIS Gregorio Marañón, IISGM, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>6</sup>IIS Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain; <sup>7</sup>Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>8</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Cádiz, Cádiz, Spain; <sup>9</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>10</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>11</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Cádiz, Cádiz, Spain; <sup>12</sup>Hospital Clínic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*To whom correspondence should be addressed; 28040, Madrid, Spain; tel: +34 91 394 1478, fax: +34 91 394 1464, e-mail: [jcleza@med.ucm.es](mailto:jcleza@med.ucm.es)

All the authors were from Flamm-PEPs, a Spanish multicentric, collaborative, and translational group inside Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) aimed to study inflammatory pathways in psychosis both as possible biomarkers and as possible new therapeutical targets.

**Background:** Schizophrenia is a chronic syndrome of unknown etiology, predominantly defined by signs of psychosis. The onset of the disorder occurs typically in late adolescence or early adulthood. Efforts to study pathophysiological mechanisms in early stages of the disease are crucial in order to prompt intervention. **Methods:** Case-control study of first-episode psychotic (FEP) patients and matched controls. We recruited 117 patients during the first year after their FEP according to the DSM-IV criteria and recruited 106 gender-, race-, and age-matched controls between September 2010 and June 2011. **Results:** Biochemical studies carried out in peripheral mononuclear blood cells (PMBC) and plasma evidence a significant increase in intracellular components of a main proinflammatory pathway, along with a significant decrease in the anti-inflammatory ones. Multivariate logistic regression analyses identified the expression of inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in PMBC and homocysteine plasma levels as the most reliable potential risk factors and the inhibitor of the inflammatory transcription factor NFκB, IκBα, and the anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ<sub>2</sub> as potential protection factors. **Discussion:** Taken as a whole, the results of this study indicate robust phenotypical differences at the

cellular machinery level in PMBC of patients with FEP. Although more scientific evidence is needed, the determination of multiple components of pro- and anti-inflammatory cellular pathways including the activity of nuclear receptors has interesting potential as biological markers and potential risk/protective factors for FEP. Due to its soluble nature, a notable finding in this study is that the anti-inflammatory mediator 15d-PGJ<sub>2</sub> might be used as plasmatic biomarker for first episodes of psychosis.

**Key words:** first-episode psychosis/inflammatory balance/schizophrenia/biomarker

### Introduction

Schizophrenia is a chronic syndrome of unknown etiology, predominantly defined by signs of psychosis. The onset of the disorder occurs typically in late adolescence or early adulthood and includes positive, negative, affective and cognitive symptoms.<sup>1</sup> While around 3% of the general population suffers a first episode of psychosis (FEP) along their life, schizophrenia affects approximately 1% of the population worldwide.<sup>2</sup>

RESEARCH ARTICLE

# Pro-/Antiinflammatory Dysregulation in Early Psychosis: Results from a 1-Year Follow-Up Study

Borja García-Bueno, PhD BSci; Miquel Bioque, PhD MD; Karina S. MacDowell, BSci; Javier Santabàrbara, PhD MD; Mónica Martínez-Cengotitabengoa, PhD BPharm; Carmen Moreno, PhD MD; Pilar A. Sáiz, PhD MD; Esther Berrocoso, PhD BPharm; Patricia Gassó, PhD BSci; M. Fe Barcones, PhD MD; Ana González-Pinto, PhD MD; Mara Parellada, PhD MD; Julio Bobes, PhD MD; Juan A. Micó, PhD MD; Miguel Bernardo, PhD MD; Juan C. Leza, PhD MD; from the FLAMM-PEPs\* study, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University, Instituto de Investigación Sanitaria -IIS- Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain (Drs García-Bueno, MacDowell, and Leza); Unitat d'Esquizofrènia Clínic, Hospital Clínic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain (Drs Bioque and Bernardo); Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain (Dr Santabàrbara); Hospital Universitario, Alava, EHU/UPV and National Distance Education University, Vitoria, Spain (Drs Martínez-Cengotitabengoa and González-Pinto); Child and Adolescent Psychiatry Department IIS Gregorio Marañón (IISGM), Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain (Drs Moreno and Parellada); Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain (Drs Sáiz and Bobes); Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Cádiz, Cádiz, Spain (Drs Berrocoso and Micó); Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain (Dr Gassó); Hospital Clínico Universitario, Zaragoza, Spain (Dr Fe Barcones).

\*FLAMM-PEPs is a multicentric, collaborative, and translational group inside CIBERSAM with the aim to study inflammatory pathways in psychosis both as possible biomarkers and as possible new therapeutic targets incorporated in the PEPs study, a research project in first episodes of psychosis.

B.G.-B., M.B., K.S.M.D., and J.S. contributed equally to this work.

Correspondence: Juan C. Leza, MD, PhD, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain ([jcleza@med.ucm.es](mailto:jcleza@med.ucm.es)).

## Abstract

**Background:** Previous studies indicated a systemic deregulation of the pro-/antiinflammatory balance in subjects after 6 months of a first psychotic episode. This disruption was reexamined 12 months after diagnosis to identify potential risk/protective factors and associations with symptom severity.

Received: February 20, 2014; Revised: June 06, 2014; Accepted: June 27, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

**Methods:** Eighty-five subjects were followed during 12 months and the determination of the same pro-/antiinflammatory mediators was carried out in plasma and peripheral blood mononuclear cells. Multivariate logistic regression analyses were used to identify risk/protective factors. Multiple linear regression models were performed to detect the change of each biological marker during follow-up in relation to clinical characteristics and confounding factors.

**Results:** This study suggests a more severe systemic pro-/antiinflammatory deregulation than in earlier pathological stages in first psychotic episode, because not only were intracellular components of the inflammatory response increased but also the majority of soluble elements. Nitrite plasma levels and cyclooxygenase-2 expression in peripheral blood mononuclear cells are reliable potential risk factors and 15d-prostaglandin-J<sub>2</sub> plasma levels a protection biomarker. An interesting relationship exists between antipsychotic dose and the levels of prostaglandin-E<sub>2</sub> (inverse) and 15d-prostaglandin-J<sub>2</sub> (direct). An inverse relationship between the Global Assessment of Functioning scale and lipid peroxidation is also present.

**Conclusions:** Summing up, pro-/antiinflammatory mediators can be used as risk/protection biomarkers. The inverse association between oxidative/nitrosative damage and the Global Assessment of Functioning scale, and the possibility that one of the targets of antipsychotics could be the restoration of the pro-/antiinflammatory balance support the use of antiinflammatory drugs as coadjuvant to antipsychotics.

**Keywords:** first-episode psychosis, inflammation, biomarker, oxidative damage, risk/protective factors, antipsychotics

## Introduction

The onset of psychotic illness typically occurs in late adolescence or early adulthood. This first episode of psychosis (FEP) is suffered by about 3% of the population (Perälä et al., 2007) and its clinical evolution tends to chronicity. Up to 80% of the patients relapse during the next 5 years after a FEP, with major risk to become resistant to treatment. Complete remission occurs in only one-third of the patients (Huber et al., 2008).

The FEP population represents a unique opportunity to evaluate biological, clinical, and functional outcomes of psychotic disorders: research at the onset of illness avoids the effect of confounding variables (Khan et al., 2008; Bernardo et al., 2013) and early intervention mitigates progression and improves prognosis (Linszen et al., 2001).

Despite all the great efforts made involving basic and clinical science, we are still far from a complete understanding of the pathophysiology of the disorder. Not surprisingly, <50% of patients respond to initial treatments (Lewis et al., 2006). In the past 15 years, a great deal of interest has been focused on immune/inflammatory alterations and the oxidative/nitrosative consequences as key pathophysiological mechanisms involved (Müller and Schwarz, 2008; Flatow et al., 2013). Although most of the scientific evidence has been found in established schizophrenia, some studies indicate subtle alterations in inflammatory/immune mediators and oxidative/nitrosative stress at the very beginning of the disease (Borovcanin et al., 2012; Martínez-Cengotitabengoa et al., 2012). Moreover, neuroimaging studies demonstrate that neuroinflammation is already present in early stages of schizophrenia (Pasternak et al., 2012).

In contrast, fewer studies have focused on the role of antiinflammatory signaling pathways, the counterbalancing mechanisms that control the potentially deleterious proinflammatory mediators (García-Bueno et al., 2008). Recent data show a clear systemic misbalance in some pro-/antiinflammatory mediators in patients with schizophrenia (Martínez-Gras et al., 2011). Also, the increase of antiinflammatory cytokines (transforming growth factor beta and interleukin 10) seems to be a mechanism elicited by several antipsychotics (Meyer et al., 2011).

Recently, Flamm-PEPs, a multicenter study inside the Spanish national network for mental health research, presented the first integrated results about the imbalance of pro-/antiinflammatory components in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in FEP patients (García-Bueno et al., 2013). In particular, the proinflammatory pathway studied was the canonical one triggered by the activation of the nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Bierhaus et al., 2001; Madrigal et al., 2001). NF $\kappa$ B activates specific DNA sequences

in the promoter of target genes, such as those that codify for the inflammatory enzymes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the isoform 2 of cyclooxygenase (COX2). The overactivation of the enzymes produces an increase in oxidative and nitrosative mediators (ie, stable NO metabolites such as NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, prostaglandins such as PGE<sub>2</sub>), which can cause the depletion of endogenous antioxidant defences and attack membrane phospholipids, causing cell damage by lipid peroxidation (García-Bueno et al., 2008). On the other hand, endogenous counterbalancing mechanisms are activated in response to inflammatory/immune stimuli, such as peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). These nuclear receptors (mainly their gamma isoform, PPAR $\gamma$ ; Heneka and Landreth, 2007) act as ligand-dependent transcription factors, decreasing the expression of proinflammatory genes. Interestingly, several COX-derived products, such as the prostaglandin 15-deoxy-PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), act as endogenous antiinflammatory agents by targeting PPAR $\gamma$  (García-Bueno et al., 2005). Thus, the 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$  pathway is an endogenous compensatory mechanism. This pathway could also be pharmacologically stimulated, representing not only a potential biomarker but also an important new candidate therapeutic target in those neuropsychiatric disorders in which inflammation may be playing a role.

In short, the above-cited first study of Flamm-PEPs (García-Bueno et al., 2013) also showed a decrease in the 15d-PGJ<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$  pathway, demonstrating a proinflammatory phenotype in patients during their first 6 months after diagnosis. The disruption of this physiological balance is again reexamined in the present follow-up study 12 months after the inclusion of the patients in order to (1) analyze the evolution of the balance described in FEP, (2) identify potential risk/protective factors, (3) recognize associations between pro-/antiinflammatory mediators and symptoms' severity during follow-up, and finally (4) by means of multiple linear regression models, to analyze the change of every biological marker during follow-up in relation to clinical characteristics and confounding factors.

## Methods and Materials

### Subjects (see supplementary Material 1 for complete details)

A total of 117 FEP subjects and 106 gender-, race-, and age-matched healthy controls were included in the baseline Flamm-PEPs study (García-Bueno et al., 2013). From the initial sample, 85 FEP subjects were followed during the next 6 months (maximum

12 months after inclusion). Baseline inclusion criteria for patients were: (1) age: 7 to 45 years; (2) duration of the psychotic symptoms: <1 year; and (3) speak Spanish correctly. The exclusion criteria were: (1) mental retardation (IQ <70 together with impaired functioning); (2) history of traumatic head injury with loss of consciousness; and (3) history of organic disease with mental repercussions. Having designed a real-life patient, naturalistic study, substance use, or having suicidal ideation were not exclusion criteria (Bernardo et al., 2013). Controls were selected from the same geographic areas. Inclusion criteria were: (1) same gender as patients; (2) similar age ( $\pm 10\%$ ); (3) similar paternal socioeconomic status, allowing  $\pm 1$  level in the Hollingshead-Redlich scale (Hollingshead and Redlich, 1958); (4) no past or present psychiatric disorder per DSM-IV criteria; (5) speak Spanish correctly; and (6) no history of psychotic disorder among first-degree relatives. The exclusion criteria for controls were the same as for patients.

Neither the patients nor the controls presented ongoing infections, fever, allergies, or other serious medical conditions or were receiving immunosuppressive drugs or vaccinations for at least 6 months prior to inclusion in the study or antiinflammatory-analgesics in the 2 days previous to blood extraction. Clinical assessment of patients and controls included a complete medical history, physical examination, electrocardiogram, and laboratory tests (Bernardo et al., 2013).

Expert clinicians used the Spanish translation of the DSM-IV semistructured diagnostic interview to establish diagnosis in adults (First and Spitzer, 1999) and the Kiddie-Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia, Present and Lifetime Version for subjects younger than 18 years old (Ulloa et al., 2006). There was a broad age of inclusion to allow the inclusion of early-onset psychotic patients (Bernardo et al., 2013). Medical records and interviews with relatives were used as other sources of information to establish the onset of positive symptoms. The onset of the FEP was defined as the first week with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) items P1, P3, P5, P6, or G9 scoring  $\geq 4$  (García-Bueno et al., 2013). Global Assessment of Functioning scale (GAF) is a numerical scale (0–100) that measures functionality of patients based on work and social adjustment (Hall, 1995). The duration of untreated psychosis (DUP) was defined as the number of days elapsed between this onset and the beginning of the first antipsychotic treatment. DUBM was defined as the number of days elapsed between the onset of the FEP and blood sampling.

After complete description of the study to the subjects, written informed consent was obtained. The study was approved by the Ethics and Clinical Research Boards of all the hospitals involved in the study.

### Specimen Collection and Preparation (see supplementary Material 1 for complete details)

Venous blood samples (10 mL) were collected between 8:00 and 10:00 AM after overnight fasting. Blood tubes were centrifuged (641 g x 10 minutes, 4°C). The resultant plasma samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The rest of the sample was diluted in culture medium (RPMI 1640, Invitrogen), and a gradient with Ficoll-Paque (GE Healthcare) was used to isolate mononuclear cells by centrifugation (800 g x 40 minutes, room temperature). The PBMC layer was aspirated and resuspended in RPMI and centrifuged (1116 g x 10 minutes, room temperature). The supernatant was removed and the mononuclear cell enriched pellet was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Biochemical Determinations in Plasma (see supplementary Material 1 for complete details)

Prostaglandins, the COX by-products  $\text{PGE}_2$  and  $15\text{-d-PGJ}_2$ , were determined by enzyme immunoassay (Cayman Chemicals and

DRG Diagnostics, respectively). Nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), the final and stable product of NO, were determined by using the Griess method. Lipid peroxidation was determined by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay (Cayman Chemicals, Tallin, Estonia), and cotinine levels, the major degradation product of nicotine metabolism, were determined by enzyme immunoassay (Cozart).

### Biochemical Determinations in PBMC (see supplementary Material 1 for complete details)

PBMC samples were first fractionated in cytosolic and nuclear extracts. Determination of proinflammatory p65 NF $\kappa$ B subunit and ant-inflammatory PPAR $\gamma$  respective transcriptional activities were carried out in nuclear extracts from PMBC.

#### NF $\kappa$ B Activity

Activation of NF $\kappa$ B occurs by enzymatic degradation of the bound inhibitory protein (I $\kappa$ B $\alpha$ ), allowing movement from cytoplasm to the nucleus where they bind to consensus  $\kappa$ B sequences in DNA. The presence of p65 subunit in cell nuclei is considered an index of activity measured with a transcription factor assay (Cayman Chemicals, Tallin, Estonia).

#### PPAR $\gamma$ Transcription Factor

PPAR $\gamma$  transcription factor activity was determined using ELISA-based kits (Cayman Chemicals, Tallin, Estonia).

#### Western-Blot (WB) Analysis

Protein levels of I $\kappa$ B $\alpha$ , COX2, and iNOS were quantified by WB in cytosolic extracts from PBMCs. Protein levels of PPAR $\gamma$  were quantified in nuclear extracts. The housekeeping gene  $\beta$ -actin was used as loading control. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control for PPAR $\gamma$  (blots shown in the respective figures). For clarity, 2 WBs are presented in the figures representative of all the samples studied (in each different gel,  $n=3$  per group control or FEP).

### Statistical Analysis (see supplementary Material 1 for complete details)

Differences between baseline characteristics for patients and controls were assessed using chi-square, t test, or nonparametric Mann-Whitney U tests according to the distribution and scales of the variables. The effect of psychotropic medication was evaluated with linear regression models for each biomarker. To calculate the association between FEP and the level of biological markers, 5 hierarchical logistic regression models were used in which we gradually controlled for potential confounders (age, gender, body mass index [BMI], cannabis use per month, and cotinine levels). Multiple linear regression analysis was used to analyze the change in each biological marker depending on the change in demographic (gender, age, BMI), clinical variables (DUP, DUBM, GAF), antipsychotic medication (defined daily dose [DDD]), and cannabis and tobacco (cotinine).

## Results

### Demographic and Clinical Features

Table 1 presents the demographic and clinical characteristics of the FEP patients and the healthy control group. There were 32 subject from the total 117 FEP subjects who did not follow the 6-month period of study. Because of these early drop-outs, there were differences in the socioeconomic status between the groups that were not present at baseline.



**Table 1.** Demographic and Clinical Characteristics

Characteristic	Patients Baseline (N=85)	Patients Follow-up (N=85)	Controls (N=106)
Demographic characteristics			
Age, y	24.89±6.26	25.21±6.03	25.18±6.79
Sex, n (%)			
Male	60 (70.6)	—	70 (66.0)
Female	25 (29.4)	—	36 (34.0)
Psychiatric history			
Socioeconomic status			
High	16 (18.8)	—	14 (13.2)
Medium-high	7 (8.2)	—	17 (16.0)
Medium	30 (35.3)*	—	54 (50.9)
Medium-low	24 (28.2)	—	19 (17.9)
Low	8 (9.4)*	—	2 (1.9)
Ethnic group			
Caucasian	79 (92.9)	—	96 (90.6)
Gipsy	1 (1.2)	—	0 (0)
Maghrebian	1 (1.2)	—	2 (1.9)
Asian	1 (1.2)	—	0 (0)
Caribbean	1 (1.2)	—	0 (0)
Hispanic	2 (2.4)	—	6 (5.7)
Other	0 (0)	—	2 (1.9)
Age of psychosis onset	24.37±5.92	—	—
DUP, d	68.58±77.28	—	—
Diagnosis – no. (%)			
Affective Psychosis	17 (20.0)	17 (20.0)	—
Non-affective Psychosis	68 (80.0)	68 (80.0)	—
Psychopathology score			
PANSS			
Total	51.72±19.23	40.29±23.67	—
Positive	10.67±5.38	8.01±5.03	—
Negative	14.58±6.26	11.76±8.15	—
General	26.47±9.75	20.52±11.99	—
Young	1.45±3.25	1.39±3.57	—
Montgomery-Asberg	6.51±6.52	6.02±6.94	—
Overall functioning score (GAF)	68.6±13.88	72.08±17.23	—
Antipsychotic medication, n (%)			
Risperidone	30 (35.3)	21 (25.9)	—
Olanzapine	9 (10.6)	6 (7.4)	—
Aripiprazole	9 (10.6)	15 (18.5)	—
Paliperidone	7 (3.7)	5 (6.2)	—
Clozapine	5 (5.9)	6 (7.4)	—
Quetiapine	6 (7.1)	5 (6.2)	—
Ziprasidone	2 (2.4)	2 (2.4)	—
None	17 (8.9)	21 (25.9)	—
Defined daily dose of chlorpromazine equivalents, mg	282.19±253.04	298.06±303.16	—
Lithium use, n (%)	8 (9.4)	7 (8.4)	—
Body mass index	24.83±3.81*	24.65±5.73 *	23.14±3.16
Cannabis use, n (%)	18 (21.18)	4 (5.1) *	14 (16.0)
Cannabis use per month, n cigarettes	4.71±19.36	1.09±6.37	1.15±6.36
Tobacco use, n (%)	49 (57.6)	54 (65.1)*	25 (29.4)
Tobacco use per month, n cigarettes	238.9±259.08	241.98±254.11*	45.38 (119.31)
Cotinine, ng/mL	86.73±84.46	97.27±84.50*	26.28±49.31

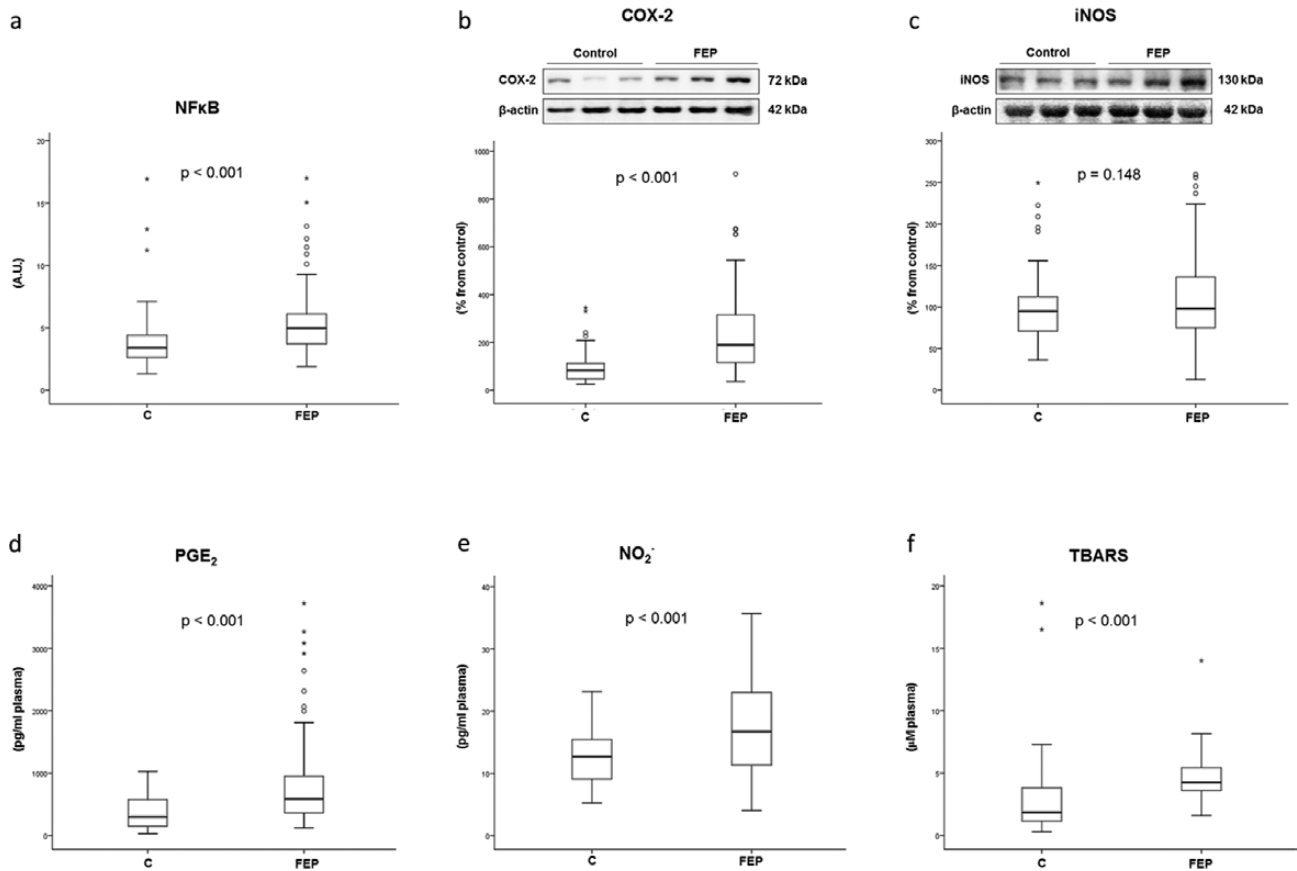
Abbreviations: DUP, duration of untreated psychosis; GAF, Global Assessment of Functioning scale.

\* P&lt;.05. Comparison between patients: follow-up and healthy controls.

### Inflammatory and Oxidative/Nitrosative Stress Markers in Control and FEP Patients

Figure 1 shows mean differences (SD) in inflammatory and oxidative/nitrosative stress markers in control and FEP patients. NFκB is a master regulator of the inflammatory and oxidative/nitrosative status of a cell. In nuclear extracts from PMBCs, its activity is increased in FEP samples (supplementary Material

2 and Figure 1a). Similarly, COX2 expression was significantly higher in FEP subjects, although the expression of iNOS was not different between groups (supplementary Material 2 and Figure 1b-c). At this particular stage of the disease, the plasma levels of PGE<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and TBARS were increased in FEP (supplementary Material 2 and Figure 1d-f, respectively). The numerical data for WB analysis from all subjects have been included in supplementary Table S3.



**Figure 1.** Mean differences (SD) in proinflammatory biomarkers between first episode of psychosis (FEP) and controls (univariate analysis). (a) Nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activity in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) nuclear extracts from FEP patients ( $n = 85$ ) and controls ( $n = 35$ ). (b) Western-blot analysis of isoform 2 of cyclooxygenase (COX2) protein (patients  $n = 85$ , controls,  $n = 88$ ); (c) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in PBMC cytosolic extracts from FEP patients ( $n = 85$ ) and controls ( $n = 88$ ); and (d) PGE<sub>2</sub> (patients,  $n = 85$ ; controls,  $n = 104$ ). (e) Plasma levels of nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (patients,  $n = 85$ ; controls,  $n = 61$ ). (f) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (patients,  $n = 85$ ; controls,  $n = 104$ ). AU, arbitrary units. Two-tailed nonparametric Mann-Whitney  $U$  test was used. ° represents an atypical value and \* an extreme value.

### Antiinflammatory Markers in Control and FEP Patients

Figure 2 shows mean differences (SD) in antiinflammatory and oxidative/nitrosative stress markers in control and FEP patients. I $\kappa$ B $\alpha$  in cytosolic extracts was not decreased in patients compared with healthy subjects (supplementary Material 2; Figure 2a). However, plasma levels of the antiinflammatory 15d-PGJ<sub>2</sub> were significantly lower in FEP (supplementary Material 2; Figure 2b).

Given that 15d-PGJ<sub>2</sub> acts as an endogenous ligand for PPAR $\gamma$ , which is considered a potent antiinflammatory transcription factor, we analyzed its expression and transcriptional activity. WB analysis revealed lower expression of PPAR $\gamma$  in patients (supplementary Material 2; Figure 2c). Moreover, its transcriptional activity was also reduced in the patient group (supplementary Material 2; Figure 2d).

### Multiple Logistic Regression Analysis

In the final multiple logistic regression model, 6 of 10 biological markers studied were significantly associated with followed FEP after controlling for all possible confounders (Table 2; supplementary Material 4). The resulting equation allows the estimation of the individual probability of FEP during a 6-month follow-up by substituting values of the biological levels and the demographic and clinical variables:  $\log (P/1-P)=7$ .

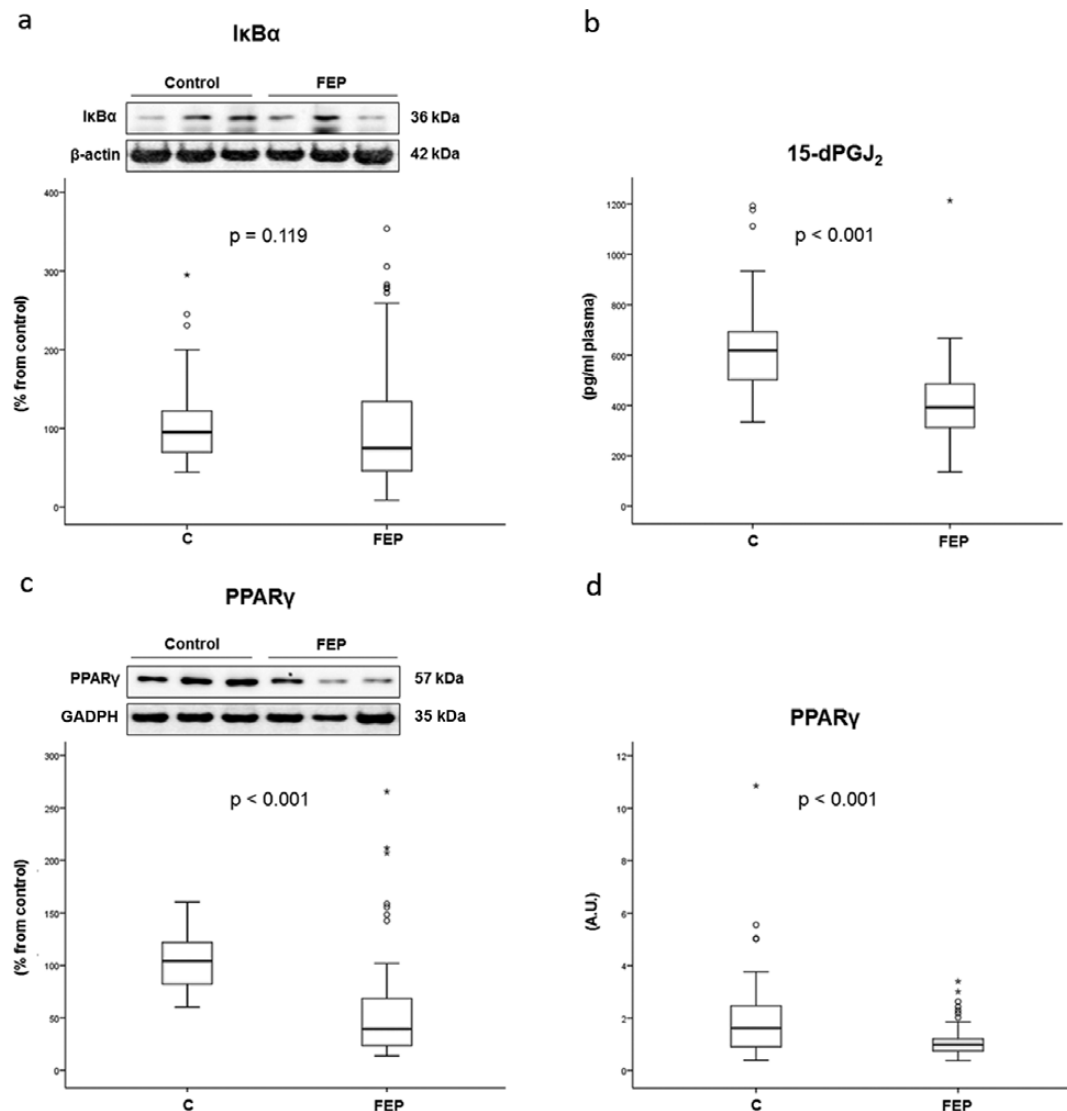
$783 + [0.005 \times \text{PGE}_2] + [0.017 \times \text{COX2}] + [0.369 \times \text{NO}_2^-] + [0.182 \times \text{TBARS}] + [-0.832 \times \text{PPAR}\gamma \text{ act}] + [-0.023 \times 15\text{d-PGJ}_2] + [0.062 \times \text{gender (male)}] + [-0.194 \times \text{age}] + [-0.070 \times \text{BMI}] + [-0.014 \times \text{cannabis use per month}] + [0.034 \times \text{cotinine}]$  (Hosmer et al., 2013).

Among the proinflammatory markers, the highest OR observed was for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (OR=1.447), meaning that for each unit increased of this biomarker, the risk of FEP increased by 44.7%  $[(e^{0.369 \times 1} - 1) \times 100]$  after controlling for remaining biological markers and all possible confounders ( $P = .023$ ). Similarly, the results were 20% for TBARS (not significant), 1.7% for COX2 ( $P = .011$ ), and 0.5% for PGE<sub>2</sub> (not significant).

Among the antiinflammatory markers, the PPAR $\gamma$  activity had the lowest OR observed (OR=0.435), meaning that the risk decreased by 56.5%  $[(e^{-0.832 \times 1} - 1) \times 100]$  for each unit of increased biomarker after controlling for remaining biological markers and all possible confounders, although it was not significant ( $P = .187$ ). Similarly, the result for 15d-PGJ<sub>2</sub> was 2.3% ( $P = .001$ ).

### Multiple Linear Regression Analysis

By means of multiple linear regression analysis, it is possible to predict the change of each biological marker from baseline to the follow-up point (6 to 12 months) controlling for a set of explanatory variables: gender, age, BMI, cannabis use, plasma cotinine levels, DDD of chlorpromazine equivalents, the DUP and the GAF scale score, and the days from diagnostic to the



**Figure 2.** Mean differences (SD) on antiinflammatory biomarkers. (a) Western-blot analysis of bound inhibitory protein (IκBα) in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cytosolic extracts (patients, n = 85; controls, n = 88); (b) Plasma levels of prostaglandin 15d-PGJ<sub>2</sub> (patients, n = 85; controls, n = 104). (c) Western-blot analysis of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPARγ; patients, n = 85; controls, n = 16). (d) Transcriptional activity of PPARγ (patients, n = 85; controls, n = 87) in PBMC nuclear extracts. AU, arbitrary units. Two-tailed t test was assessed for PPARγ protein levels, and for the rest of variables, 2-tailed nonparametric Mann-Whitney U test was used. ° represents an atypical value and \* an extreme value.

**Table 2.** Multivariate Logistic Regression Analysis

	B	SE	Wald	OR	CI 95%	P
PGE <sub>2</sub>	0.005	0.002	3.721	1.005	1.000–1.009	.054
COX2	0.017	0.007	6.509	1.017	1.004–1.031	.011
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.369	0.163	5.137	1.447	1.051–1.991	.023
TBARS	0.182	0.162	1.269	1.200	0.874–1.649	.260
PPARγ act	–0.832	0.631	1.741	0.435	0.126–1.498	.187
15d-PGJ <sub>2</sub>	–0.023	0.007	10.099	0.977	0.963–0.991	.001

Abbreviations: B, median; COX-2: cyclooxygenase 2; CI, confidence interval; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrites; OR, odds ratio; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; PPARγ act, peroxisome proliferator activated receptors activity; SE, standard error; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; 15d-PGJ<sub>2</sub>, prostaglandin 15-deoxy-PGJ<sub>2</sub>.

Association between FEP and level of biomarker. All the biomarkers were analyzed together and adjusted for age, gender, body mass index, cannabis use per month, and cotinine level. The bold values in the table represent the values reaching statistical significance ( $P < .05$ ).

blood sampling for basal values (DUBM). Four (PGE<sub>2</sub>, COX2, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and TBARS) of the 6 proinflammatory and oxidative/nitrosative biological markers studied and 2 (15dPGJ<sub>2</sub> and PPARγ activity) of the 4 antiinflammatory markers studied were significantly associated with some of the explanatory variables (Table 3).

### Inflammatory and Oxidative/Nitrosative Stress Markers

The increased plasma levels of PGE<sub>2</sub> from baseline to follow-up appeared negatively related to DDD (for each DDD unit

**Table 3.** Differences (Mean  $\pm$  SD) in the Biomarker Levels between Baseline (6 Months After Diagnosis) and 1-Year Follow-Up Patients

Marker	Patients Baseline (N=85)	Patients Follow-Up (N=85)	Statistics	P
iNOS -WBc-	131.44 $\pm$ 51.43	<b>109.05 <math>\pm</math> 52.89</b>	Z = -2.47	.013
COX2 -WBc-	161.08 $\pm$ 164.82	<b>230.60 <math>\pm</math> 169.86</b>	Z = -3.13	.002
NFkB -act-	12.13 $\pm$ 23.75	5.52 $\pm$ 2.75	Z = -0.20	.845
PGE2 -sol-	522.29 $\pm$ 770.33	<b>870.02 <math>\pm</math> 741.96</b>	Z = -4.58	<.001
NO <sub>2</sub> -sol-	14.94 $\pm$ 6.20	17.61 $\pm$ 7.34	Z = -1.88	.060
TBARS -sol-	3.65 $\pm$ 3.81	<b>4.50 <math>\pm</math> 1.75</b>	Z = -3.69	<.001
IkB $\alpha$ -WBc-	86.36 $\pm$ 49.97	104.21 $\pm$ 82.09	Z = -0.73	.468
15d-PGJ2 -sol-	571.25 $\pm$ 154.15	<b>408.89 <math>\pm</math> 150.69</b>	Z = -5.72	<.001
PPAR $\gamma$ -WBn-	79.45 $\pm$ 33.51	<b>55.94 <math>\pm</math> 49.09</b>	Z = -2.35	.019
PPAR $\gamma$ -act-	1.29 $\pm$ 0.93	1.09 $\pm$ 0.55	Z = -1.11	.267

Abbreviations: act, activity assay in nuclear extracts; sol, plasma levels of soluble compounds; COX-2, cyclooxygenase 2; IkB $\alpha$ , inhibitor of the NFkB alpha; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NFkB, nuclear transcription factor kB; NO<sub>2</sub>, nitrites; PGE2, prostaglandin E2; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor gamma; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; 15d-PGJ2, prostaglandin 15-deoxy-PGJ2.

Nonparametric Wilcoxon signed-rank test was used. The bold values in the table represent the values reaching statistical significance ( $P < .05$ ). Analyses carried out in WB: protein expression, determined by western blot in PBMC (WBc: in cytoplasmatic fraction; WBn: in nuclear fraction). See Methods for details.

increased during this period, PGE<sub>2</sub> will decrease 0.733 units during follow-up, once controlling the effect of the increase in the other explanatory variables; [Table 4](#)). Also, PGE<sub>2</sub> will decrease 3.387 units for each increase in 1 unit of cotinine plasma levels and will increase 0.714 units DUBM. COX2 expression was also related to cotinine: it will increase 0.672 units for each unit of cotinine level increased from basal to follow-up. The increase in nitrite levels also appeared related to the explanatory variables chosen: NO<sub>2</sub><sup>-</sup> increased by 7.451 units more in female patients than in male patients ([Kleinbaum et al., 2008](#)).

The increase of TBARS plasma levels from basal to follow-up, the final marker of systemic oxidative/nitrosative stress, also appeared related to clinical status: for each unit of GAF scale increase, TBARS decreases 0.12 units. Finally, for DUBM, TBARS will increase 0.005 units.

### Antiinflammatory Markers

Plasma levels of 15d-PGJ<sub>2</sub> from baseline to the follow-up were positively related to DDD (for each DDD unit during this period, 15d-PGJ<sub>2</sub> will increase 0.333 units during follow-up, once controlling the effect of the increase in the other explanatory variables; [Table 4](#)). Finally, the activity of PPAR $\gamma$  will decrease 0.033 units for each point in GAF score and increases 0.75 units for each year of age.

### Discussion

In this follow-up study, we have strengthened the evidence of systemic inflammatory alterations in FEP patients. Previously, with this same cohort of patients, we described phenotypical differences in proinflammatory mediators at the cellular machinery level in PBMCs, but the resultant soluble elements were not significantly altered ([García-Bueno et al., 2013](#)). However, 6 months later, some of the soluble elements analyzed already appeared significantly altered (PGE<sub>2</sub>, TBARS, 15d-PGJ<sub>2</sub>), suggesting the existence of a deeper deregulation of the pro/antiinflammatory balance (supplementary Table S5).

The multivariate logistic regression analysis identified the plasma levels of the marker of oxidative/nitrosative damage NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and the COX2 expression in PBMCs as the most reliable potential risk factors. Also, plasma levels of the antiinflammatory 15d-PGJ<sub>2</sub> might be used as a potential protection factor for FEP.

The current longitudinal approach allowed the analysis of the changes of every biological marker between 6 and 12 months after the inclusion of the patients in relation to the changes of clinical characteristics and confounding factors. Especially remarkable are the associations found between the antipsychotic dose and the change in the plasma levels of PGE<sub>2</sub> (inverse) and 15d-PGJ<sub>2</sub> (direct). Indeed, these results suggest that one of the therapeutic mechanisms of antipsychotics may be the restoration of the pro-/antiinflammatory balance disrupted in FEP. It is worth noting that 25.9% of the FEP patients recruited here were receiving medication with risperidone, an atypical antipsychotic drug that normalizes increased inflammatory mediators (cytokines and inflammatory PGs) ([Sugino et al., 2009](#); [Adkins et al., 2012](#)) and restores antiinflammatory pathways in murine models of neuroinflammation ([MacDowell et al., 2013](#)). In our conditions, the increase of inflammation during follow-up can be due to the fact that antipsychotics are not able to completely reverse the inflammation associated with the disease, and this circumstance could justify the potential use of antiinflammatory drugs as coadjuvant to antipsychotics for the treatment of the psychotic disease ([Sommer et al., 2012](#)).

Other results deserving attention are the opposite relationships found between cotinine levels and COX-2 protein expression in PBMCs and PGE<sub>2</sub> plasma levels. Nicotine effects on the cyclooxygenase pathway in an inflammatory context are complex and sometimes contradictory, depending of the nicotine levels reached, subtype of receptor activated, the route of administration of nicotine, and whether there is a subjacent pathological state ([Piao et al., 2009](#); [Gonçalves et al., 2011](#); [Hurley and Tizabi, 2013](#)). Our paradoxical results need to be further explored to analyze the effects of nicotine on the antiinflammatory  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ([Hurst et al., 2013](#)) or on the expression and enzymatic activity of tissue-specific PGE<sub>2</sub> synthases, such as microsomal-PGE-synthase-1. Our results support the idea that cigarette smoking is a potent confounding factor to control for when the inflammation/innate immune system is studied.

Regarding other potential confounding factors, the results described here suggest that the alterations in the pro-/antiinflammatory balance in FEP patients are not related to changes in BMI in both time-points studied (see supplemental Table S6). In addition, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> plasma levels increased more in female than in male patient subjects between both time points studied, age was directly related to PPAR $\gamma$  activity, and cannabis use

Table 4. Multiple Linear Regression Analysis

	PGE <sub>2</sub>		COX2		NO <sup>-</sup> <sub>2</sub>		TBARS		15d-PGJ <sub>2</sub>		PPAR $\gamma$ act.	
	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P	$\beta$	P
Gender (ref. female)	-45.635	.805	-37.395	.426	7.451	<b>.015</b>	1.793	.083	-31.095	.625	-0.179	.632
Age	-5.010	.759	-0.462	.915	-0.042	.870	0.108	.232	-11.284	.052	0.075	<b>.048</b>
Body mass index	-1.898	.932	5.596	.281	-0.038	.903	-0.217	.073	2.463	.743	-0.141	.093
Antipsychotic DDD	-0.733	<b>.028</b>	0.148	.085	0.006	.236	-0.001	.604	0.333	<b>.006</b>	0.000	.888
DUP	1.020	.462	0.187	.578	0.019	.355	-0.013	.080	-0.025	.957	0.003	.274
GAF	-3.401	.660	2.490	.206	0.122	.263	-0.120	<b>.005</b>	0.783	.763	-0.033	<b>.024</b>
Cannabis use per month	-0.619	.890	-1.296	.215	-0.190	<b>.008</b>	0.015	.531	0.994	.510	-0.003	.714
Cotinine plasma levels	-3.387	<b>.007</b>	0.672	<b>.046</b>	0.001	.955	0.001	.927	0.503	.225	0.002	.343
DUBM	0.714	<b>.017</b>	-0.047	.500	0.001	.837	0.005	<b>.002</b>	-0.057	.563	0.000	.555

Abbreviations:  $\beta$ , linear regression coefficient; BMI, body mass index; DDD, defined daily dose of antipsychotic chlorpromazine equivalents; DUBM, number of days elapsed between the onset of the FEP and blood samplings; DUP, duration of untreated psychosis; GAF, Global Assessment of Functioning scale. Change of each biological marker (from baseline to the follow-up point) depending on demographic and clinical variables. The bold values in the table represents the values reaching statistical significance ( $P < .05$ ).

per month was inversely related to NO<sup>-</sup><sub>2</sub> plasma levels. Further studies are needed to corroborate whether these relationships are particular for PEPs or can be extended to other states of psychotic disease. From a clinical point of view, the inverse relationship found between the GAF scale and TBARS plasma levels is particularly relevant and provides scientific evidence of a direct role for oxidative/nitrosative stress cellular damage in the general symptomatology of FEP and possibly in other disorders with psychotic symptoms. In a comparable cohort of patients, it has been reported that cognitive deficits are related to oxidative stress (Martínez-Cengotitabengoa et al., 2012).

As previously described, the longitudinal design of this study allowed to analyze the evolution of the inflammatory response taking place in FEP patients. The comparison of the data obtained in the 2 selected time-points illustrates the complex and continuous dynamic changes of the inflammatory response in the natural course of incipient psychosis. This complexity might be one of the causes of controversy regarding the specific role of inflammatory mediators in the pathophysiology of the different types of psychotic disorders (Meyer et al., 2011) and the difficulties in the design and proper use of treatment strategies based on classical antiinflammatory drugs, producing in most cases only relatively modest improvements in clinical symptoms in the early stage of schizophrenia (Sommer et al., 2012).

The results of the multivariate analysis show potential risk/protective factors common in both baseline and follow-up visits. This is the case of COX2 protein levels in PBMCs as a risk factor and 15d-PGJ<sub>2</sub> plasma levels as a putative protection factor. However, other plausible biomarkers have lost their validity (ie, IkB $\alpha$ ). These results illustrate how one biomarker could be useful in a limited phase of the natural course of the disease (status biomarker), but others are more general for all the phases of the disease (trait biomarker), as has been shown for specific cytokines (Miller et al., 2011).

The reformulation of the traditional conception of the psychotic illness, being now considered as a heterogeneous disorder with multisystemic impact in addition to its psychiatric expression (Kirkpatrick, 2009), is clearly supported by these data. Recent studies compared the same immune biomarkers (eg, cytokines such as IFN $\gamma$ ) in plasma and postmortem brain tissue from control and subjects with schizophrenia and found similar alterations in both compartments, validating the concept that schizophrenia can be studied through systemic biomarkers (Harris et al., 2012). A recent review suggested a link between peripheral inflammatory/immune processes and MRI-detected

anomalies in the brain (Frodl and Amico, 2014), and studies in postmortem brain tissue from subjects with schizophrenia showed increased levels of some of the pro-/antiinflammatory and oxidative/nitrosative stress markers studied here (NF $\kappa$ B, COX2, TBARS) (Rao et al., 2013). Our data might serve to elucidate whether the alterations of these inflammatory risk/protection biomarkers could have etiological relevance and not only utility for diagnosis and monitoring the evolution of the disease (Bergink et al., 2013).

The present study identifies vulnerability conditions related to PBMC pro-/antiinflammatory pathways in FEP patients. One special feature of the study is that it includes a wide spectrum of biochemical markers in both PBMCs and plasma, allowing to establish in-depth relationships between multiple components of the signalling pathways. In addition, we have used the DUBM variable that enhances the accuracy of the values obtained in each biomarker. Thus, this variable is especially relevant in the particular case of the proinflammatory/oxidative stress biomarkers PGE<sub>2</sub> and TBARS, which significantly increase depending on the days between diagnosis and the moment of blood extraction. Additional studies that analyze inflammatory/immune biomarkers in psychiatric disease should take into account and control for this variable.

## Limitations

The present results may also explain one possible limitation reported in our first study (García-Bueno et al., 2013) about the role of stress in the observed changes: stress exposure could be one of the factors implicated in the onset of FEP (Holtzman et al., 2013), and stress could contribute to the observed shift towards enhanced pro- vs antiinflammatory signalling (García-Bueno et al., 2005). However, current results indicate a clear evolution after 1 year (not only were intracellular components of the inflammatory response increased, but also the majority of resultant proinflammatory soluble elements and the oxidative/nitrosative stress markers). Also, the deregulation of the balance is permanent in chronic schizophrenic inpatients with a 13-year history of psychosis (Martínez-Gras et al., 2011). This evolution suggests that the inflammatory process is not merely due to acute stress exposure in the beginning of FEP.

Control subjects were not followed 6 months after baseline as patients were, and this could be considered a major limitation. When this study was designed, our hypothesis was that the pro-/antiinflammatory mediators analyzed did not significantly



change in 6 months in control subjects. However, this possibility exists, and the interpretation of the results obtained 6 months after baseline with regards to control subjects should be done with caution. The main objective of the experimental design made was to study the intra-subject evolution of the disease between both time points.

It is worth noting that 75% of the FEP patients included in our study were under atypical antipsychotic treatment, and there is increasing evidence on the potential antiinflammatory effects of antipsychotics (Sugino et al., 2009; Miller et al., 2011; MacDowell et al., 2013). Nevertheless, we tried to control the possible confounding effect of antipsychotic treatment through a multiple linear regression analysis.

In addition, each antipsychotic group and lithium have very different impacts on metabolic signalling (weight gain), and with the approximation made with the chlorpromazine equivalents, their differential profile could be lost. To resolve this issue, we analyzed if there are differences in weight gain between basal and follow-up time points studied and between the different antipsychotic groups and lithium, respectively (supplementary Tables S6-8) and there were no significant differences.

Finally, it would be necessary to determine if the peripheral changes found in inflammatory-related molecules in FEP subjects could also take place at a central level.

## Conclusion

In conclusion, this follow-up study corroborates the existence of a deregulated systemic pro-/antiinflammatory balance in FEP, which becomes more severe during the initial 1 year after the diagnosis. The multivariate analysis applied shows potential risk/protective factors in both time points studied (COX-2 protein levels in PBMCs and 15d-PG<sub>2</sub> plasma levels) that can be considered trait markers and other specific state biomarkers (initial: IkB $\alpha$ ; 1-year evolution: NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and TBARS). Striking results come from the multiple linear regression approach, which shows how one of the targets of antipsychotic treatment may be the restoration of the inflammatory balance. Finally, from a clinical point of view, the inverse relationship found between the final product of oxidative/nitrosative cellular damage TBARS and the GAF scale is especially relevant in order to justify the development of antioxidant/antiinflammatory treatment strategies not only for established schizophrenia but also for earlier stages of a psychotic disorder.

## Supplementary Material

For supplementary material accompanying this paper, visit <http://www.ijnp.oxfordjournals.org/>

## Acknowledgments

This work was supported by CIBERSAM Intramural Projects 2010 (P02): Flamm-PEPs, Inflammatory alterations in schizophrenia: search of biological markers in first psychotic episodes, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias and also by PI 10/0123 to J.C.L. and PI 1100325 to M. Bernardo.

## Statement of Interest

The authors provide full disclosure of any and all biomedical financial interests. The authors declare that there are not conflicts of interest.

## References

- Adkins DE, Khachane AN, McClay JL, Aberg K, Bukszár J, Sullivan PF, van den Oord EJ (2012) SNP-based analysis of neuroactive ligand-receptor interaction pathways implicates PGE2 as a novel mediator of antipsychotic treatment response: data from the CATIE study. *Schizophr Res* 135:200–201.
- Bergink V, Gibney SM, Drexhage HA (2013) Autoimmunity, inflammation and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry* S0006–3223(13)00946–3.
- Bernardo M, Bioque M, Parellada M, Saiz Ruiz J, Cuesta MJ, Llerena A, Sanjuán J, Castro-Fornieles J, Arango C, Cabrera B; PEPs Group (2013) Assessing clinical and functional outcomes in a gene-environment interaction study in first episode of psychosis (PEPs). *Rev Psiquiatr Salud Ment* 6:4–16.
- Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP (2003) A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1920–1925.
- Borovcanin M, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic Dejanovic S, Bankovic D, Arsenijevic N, Lukic ML (2012) Elevated serum level of type-2 cytokine and low IL-17 in first episode psychosis and schizophrenia in relapse. *J Psychiatr Res* 46:1421–1426.
- First M, Spitzer R, Gibbon M, Williams J, eds (1999) *Entrevista clínica estructurada para los trastornos del eje-I del DSM-IV*. Barcelona: Masson.
- Flatow J, Buckley P, Miller BJ (2013) Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 74:400–409.
- Frodl T, Amico F (2014) Is there an association between peripheral immune markers and structural/functional neuroimaging findings? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48:295–303.32.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry* 57: 885–894.
- García-Bueno B, Caso JR, Leza JC (2008) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1136–1151.
- García-Bueno B, Bioque M, MacDowell KS, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L, Rodríguez-Jiménez R, Sáiz PA, Castro C, Lafuente A, Santabárbara J, González-Pinto A, Parellada M, Rubio G, García-Portilla MP, Micó JA, Bernardo M, Leza JC (2013) Pro-/anti-inflammatory dysregulation in patients with first episode of psychosis: toward an integrative inflammatory hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 2013; e-pub ahead of print 13 March 2013; PMID:23486748.
- Gonçalves RB, Coletta RD, Silvério KG, Benevides L, Casati MZ, da Silva JS, Nociti FH Jr (2011) Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res* 60:409–424.
- Hall RC (1995). Global assessment of functioning. A modified scale. *Psychosomatics*. 36:267–275.
- Harris LW, Pietsch S, Cheng TM, Schwarz E, Guest PC, Bahn S (2012) Comparison of peripheral and central schizophrenia biomarker profiles. *PLoS One* 7:e46368.
- Heneka MT, Landreth GE (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1771:1031–1045.
- Hollingshead AB, Redlich FC, eds (1958) *Social class and mental illness*. New York: Wiley.
- Holtzman CW, Trotman HD, Goulding SM, Ryan AT, Macdonald AN, Shapiro DI, Brasfield JL, Walker EF (2013) Stress and neu-

- rodevelopmental processes in the emergence of psychosis. *Neuroscience* 249:172–191.
- Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX (2013) *Applied logistic regression*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Huber CG, Naber D, Lambert M (2008) Incomplete remission and treatment resistance in first-episode psychosis: definition, prevalence and predictors. *Expert Opin Pharmacother* 9:2027–2038.
- Hurley LL, Tizabi Y (2013). Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotox Res*. 23:131–144.
- Hurst R, Rollema H, Bertrand D (2013) Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther*. 137:22–54.
- Kahn RS, Fleischhacker WW, Boter H, Davidson M, Vergouwe Y, Keet IP, Gheorghe MD, Rybakowski JK, Galderisi S, Libiger J, Hummer M, Dollfus S, López-Ibor JJ, Hranov LG, Gaebel W, Peuskens J, Lindefors N, Riecher-Rössler A, Grobbee DE; EUFEST study group (2008) Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. *Lancet* 371:1085–1097.
- Kirkpatrick B (2009) Schizophrenia as a systemic disease. *Schizophr Bull* 35:381–382.
- Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE, Nizam A (2008) *Applied regression analysis and other multivariable methods*. 4th ed. Thomson: Belmont, CA.
- Lewis DA, González-Burgos G (2006) Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nature Med* 12:1016–1022.
- Linszen D, Dingemans P, Lenior M (2001) Early intervention and a five year follow up in young adults with a short duration of untreated psychosis: ethical implications. *Schizophr Res* 51:55–61.
- MacDowell KS, García-Bueno B, Madrigal JL, Parellada M, Arango C, Micó JA, Leza JC (2013) Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:121–135.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2001) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem* 76:532–538.
- Martínez-Cengotitabengoa M, Mac-Dowell KS, Leza JC, Micó JA, Fernandez M, Echevarría E, Sanjuan J, Elorza J, González-Pinto A (2012) Cognitive impairment is related to oxidative stress and chemokine levels in first psychotic episodes. *Schizophr Res* 137:66–72.
- Martínez-Gras I, Pérez-Nievas BG, García-Bueno B, Madrigal JL, Andrés-Esteban E, Rodríguez-Jiménez R, Hoenicka J, Palomo T, Rubio G, Leza JC (2011) The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 and its nuclear receptor PPARgamma are decreased in schizophrenia. *Schizophr Res* 128:15–22.
- Meyer U (2011) Anti-inflammatory signaling in schizophrenia. *Brain Behav Immun* 25:1507–1518.
- Meyer U, Schwarz MJ, Müller N (2011) Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol Ther* 132:96–110.
- Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B (2011) Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry* 70:663–671.
- Müller N, Schwarz MJ (2008) A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258 Suppl 2:97–106.
- Pasternak O, Westin CF, Bouix S, Seidman LJ, Goldstein JM, Woo TU, Petryshen TL, Meshulam-Gately RI, McCarley RW, Kikinis R, Shenton ME, Kubicki M (2012) Excessive extracellular volume reveals a neurodegenerative pattern in schizophrenia onset. *J Neurosci* 32:17365–17372.
- Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsä E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppä T, Härkänen T, Koskinen S, Lonnqvist J (2007) Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry* 64:19–28.
- Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, Lukas RJ, Wu J, Shi FD (2009) Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin* 30:715–722.
- Rao JS, Kim HW, Harry GJ, Rapoport SI, Reese EA (2013) Increased neuroinflammatory and arachidonic acid cascade markers, and reduced synaptic proteins, in the postmortem frontal cortex from schizophrenia patients. *Schizophr Res* 147:24–31.
- Sommer IE, de Witte L, Begemann M, Kahn RS (2012) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in schizophrenia: ready for practice or a good start? A meta-analysis. *J Clin Psychiatry* 73:414–419.
- Sugino H, Futamura T, Mitsumoto Y, Maeda K, Marunaka Y (2009) Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:303–307.
- Ulloa RE, Ortiz S, Higuera F, Nogales I, Fresán A, Apiquian R, Cortés J, Arechavaleta B, Foullieux C, Martínez P, Hernández L, Domínguez E, de la Peña F (2006) [Interrater reliability of the Spanish version of Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children--Present and Lifetime version (K-SADS-PL)]. *Actas Esp Psiquiatr* 34:36–40.